

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor : Prof. Dr. W. Boguth

Mikromethode
zur Bestimmung der Proteinbindung
niedermolekularer Substanzen
mittels Mikrophotometrie
an Sephadexkugeln

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Melitta Just
Tierärztin aus Ratingen

Gießen 1970

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Boguth

Mikromethode zur Bestimmung der Proteinbindung
niedermolekularer Substanzen mittels
Mikrophotometrie an Sephadexkugeln

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Melitta Just
Tierärztin aus Ratingen

Gießen 1970



Mit Genehmigung der Vaterländischen Gesellschaft
in Gießen

Bekannt

Prof. Dr. H. Völzmann

Berichterstatter

Prof. Dr. Dr. W. Bogen

Meinen Eltern

Tag der öffentlichen Prüfung



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545904_0026

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Prof. Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Boguth

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

	Seiten
I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	3
1. Allgemeine Theorie der Proteinbindung	3
2. Methoden zur quantitativen Bestimmung der Proteinbindung	8
3. Methoden zur Charakterisierung der Proteinbindung	13
4. Bindungsmechanismen	17
III. Methode und eigene Untersuchungen	19
1. Prinzip der Methode	19
2. Meßvorgang am Mikroskop-Photometer	23
2.1. Mikroskopische und photometrische Geräte	23
2.2. Auswahl der Meßbedingungen	24
2.3. Meßvorgang	25
2.4. Herstellung der Meßkammern	26
3. Bestimmung der Kugeleigenschaften von Sephadex	27
3.1. Beziehung zwischen der geometrischen Größe h , dem Brechungsindex und dem Matrixanteil	27
3.2. Bestimmung von h	30
3.3. Bestimmung von n_s und f	32

4. Bestimmung der Adsorption der niedermolekularen Substanz an Sephadex	34
4.1. Definition der Adsorption	34
4.2. Probenansatz für die Adsorption	34
4.3. Berechnung der Konstanten der Adsorption	35
5. Bestimmung der Proteinbindung der niedermolekularen Substanz	37
5.1. Absorptionsspektren der Farbstoffe in Proteinlösung	37
5.2. Probenansatz für die Proteinbindung	44
5.3. Berechnung der freien Farbstoffkonzentration	44
IV. Ergebnisse	47
1. Adsorption der Farbstoffe an Sephadex	47
2. Albuminbindung der Farbstoffe	50
2.1. Erythrosin	51
2.1.1. Prozentualer Anteil α bzw. β	52
2.1.2. Gesamtbindungskonstante, Anzahl der Bindungsstellen, freie Reaktionsenergie	53
2.2. Chrysoin	61
2.2.1. Prozentualer Anteil α bzw. β	61
2.2.2. Gesamtbindungskonstante, Anzahl der Bindungsstellen, freie Reaktionsenergie	63
2.3. Evans Blau	68
2.4. Amaranth	72
2.5. Orange	75
2.5.1. Prozentualer Anteil α bzw. β	76
2.5.2. Gesamtbindungskonstanten, Anzahl der Bindungsstellen, freie Reaktionsenergien	76

V.	Diskussion	80
1.	Diskussion der Methode	80
2.	Diskussion der Ergebnisse	83
VI.	Zusammenfassung	87
	Literaturverzeichnis	
	Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

Zu den Eigenschaften der Eiweißkörper gehört ihr Vermögen, mit niedermolekularen Substanzen in Wechselbeziehung zu treten.

Für Hormone und Vitamine sind spezifische Proteine der α - und β -Globulingruppe im Plasma nachgewiesen; so gehören z.B. die Träger des Cortisols (DAUGHADAY, 1962; HOCHHEUSER, 1969) und des Thyroxins (GOLDSMITH, 1967) zu den α -Globulinen. Für das Cobalamin findet sich ein Träger unter den α_1 -Globulinen, ein zweiter unter den β -Globulinen (HOM und OLESEN, 1967). Diese spezifischen Träger besitzen für die entsprechende Substanz eine hohe Affinität bei meist geringer Kapazität. Körperfremde Stoffe verschiedenster chemischer Struktur werden dagegen an Plasmaalbumin gebunden (BENNHOLD, 1938; GOLDSTEIN, 1949).

Dies ist von großem pharmakologischen Interesse, da Pharmaka als niedermolekulare Substanzen in ihrer Wirksamkeit entscheidend von ihrer Proteinbindung abhängig sind.

Es ist bekannt, daß nur der freie Anteil eines Arzneimittels die Blutbahn verlassen und mit den Rezeptoren in Wechselbeziehung treten kann (BRODIE und HOGDEN, 1957), d.h. der gebundene Anteil ist biologisch unwirksam. Der freie und gebundene Anteil stehen jedoch

in einem dynamischen Gleichgewicht, wobei die Gleichgewichtseinstellung innerhalb kürzester Zeit erfolgt (THORP, 1964). Dadurch wirkt der gebundene Anteil im Sinne eines Depots; denn die Substanz wird in dem Maße aus dem Komplex mit dem Protein abdissoziiert, wie freier Anteil die Blutbahn verläßt. Auf diese Weise kann die freie Konzentration auch über längere Zeit konstant gehalten werden, und zwar um so länger, je größer der gebundene Anteil ist. Damit erfüllt die Proteinbindung eine Pufferfunktion (KRIEGELSTEIN, 1969). Die Konzentration einer Substanz in allen extravasalen Körperflüssigkeiten hängt ebenfalls von der Konzentration des freien Anteils ab, da diese Flüssigkeiten mit der freien Konzentration im Blut im Gleichgewicht stehen (BRODIE, 1964).

Auch der glomerulären Filtration ist nur der freie Anteil zugänglich; für den Abbau in der Leber wird das gleiche angenommen (NEWBOLD und KILPATRICK, 1960). Schließlich beruht die Wirkung mancher Pharmaka auf der Verdrängung körpereigener Substanzen aus ihrer Proteinbindung; z.B. beruht die antirheumatische Wirkung der Phenylbutazonanalogen u.a. auf ihrer Freisetzung von Cortisol aus der Bindung an Transcortin (BRODIE, 1965).

Es ist also von größter Bedeutung, die Plasmaproteinbindung niedermolekularer Substanzen zu kennen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zu entwickeln, die die quantitative Bestimmung der Proteinbindung in kleinsten Serummengen erlaubt.

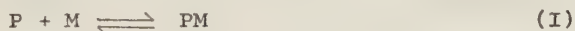
II. LITERATURÜBERSICHT

1. Allgemeine Theorie der Proteinbindung

Die Wechselwirkung zwischen Proteinen und niedermolekularen Substanzen wird allgemein als eine Reaktion aufgefaßt, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht.

(KLOTZ, 1946; SCATCHARD, 1949; HUGHES und KLOTZ, 1956; SCHOLTAN, 1962.)

Besitzt ein Protein (P) für ein Molekül des anderen Stoffes (M) eine bindende Gruppe, so läßt sich die Bindung beider durch die Gleichung des Massenwirkungsgesetzes beschreiben:



Die Gleichgewichtskonstante der Bindung (Bindungskonstante) ist:

$$k = \frac{(PM)}{(P) \cdot (M)} \quad (II)$$

Die durchschnittliche Anzahl kleiner Moleküle, die von einem Proteinmolekül gebunden werden, bezeichnet man als das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$. Es gibt das Verhältnis der Molarität der gebundenen kleinen Moleküle zur Molarität der Proteinlösung (P_0) an:

$$\bar{r} = \frac{(PM)}{(P_0)} = \frac{(PM)}{(P) + (PM)} \quad \left[\frac{\text{Mol}}{\text{Mol}} \right] \quad (III)$$

Da die Konzentration des Komplexes zwischen Protein und niedermolekularer Substanz nach Gleichung (II) gleich $k \cdot (P) \cdot (M)$ ist, gilt für $\bar{r}$:

$$\bar{r} = \frac{k \cdot (P) \cdot (M)}{(P) + k \cdot (P) \cdot (M)} = \frac{k \cdot (M)}{1 + k \cdot (M)} \quad (IV)$$

Ein Proteinmolekül bindet meist mehr als ein kleines Molekül, so daß es n bindende Gruppen besitzt.

Wenn diese verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander und mit der gleichen Affinität kleine Moleküle binden, kann das Massenwirkungsgesetz angewandt werden, als befände sich jede Gruppe an einem anderen Proteinmolekül (SCATCHARD, 1949). Für $\bar{r}$ gilt dann:

$$\bar{r} = \frac{n \cdot k \cdot (M)}{1 + k \cdot (M)} \quad (V)$$

Die durchschnittliche Anzahl besetzter Gruppen an einem Proteinmolekül kann also maximal gleich n sein.

Gleichung V kann in folgender Weise umgeformt werden:

$$\frac{\bar{r}}{n} = \frac{1 + k \cdot (M)}{n \cdot k \cdot (M)} = \frac{1}{n \cdot k} \cdot \frac{1}{(M)} + \frac{1}{n} \quad (VI)$$

$$\text{oder: } \frac{\bar{r}}{(M)} = n \cdot k - \bar{r} \cdot k = k \cdot (n - \bar{r}) \quad (VII)$$

$$\text{oder: } \frac{\bar{r}}{n - \bar{r}} = k \cdot (M) \quad (VIII)$$

(N) ist die freie Gleichgewichtskonzentration der niedermolekularen Substanz ($= c_f$), k ist die Einzelbindungskonstante einer Bindungsstelle; $n \cdot k = K_1$ ist die Gesamtbindungskonstante aller Bindungsstellen, die die gleiche Affinität zu dem niedermolekularen Stoff haben. Ihr Kehrwert ist die entsprechende Konstante der Dissoziation.

Die meisten niedermolekularen Substanzen treten jedoch mit Bindungsstellen des Proteinmoleküls verschiedener Affinität in Wechselwirkung. Das Proteinmolekül besitzt dann m , voneinander verschiedene Sätze bindender Gruppen, wobei ein Satz n_1 Bindungsstellen mit einer Gesamtbindungskonstanten K_1 , ein zweiter Satz n_2 Bindungsstellen mit einer Gesamtbindungskonstanten K_2 hat, etc.

Für den Fall, daß die Bindung einer niedermolekularen Substanz an Protein durch zwei Sätze bindender Gruppen charakterisiert ist, gilt nach KARUSH (1950) die nach SCATCHARD et al. (1950) abgeleitete Gleichung, die von TERESI und LUCK (1951) auf Fettsäuresalze angewandt wurde:

$$\frac{\bar{r}}{c_f} = \frac{n_1 \cdot K_1}{1 + K_1 \cdot c_f} + \frac{n_2 \cdot K_2}{1 + K_2 \cdot c_f} \quad (\text{IX})$$

$$n = n_1 + n_2$$

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\bar{r}}{c} = n_1 K_1 + n_2 K_2$$

Jede Erweiterung um einen neuen Satz bindender Gruppen führt zwei zusätzliche Parameter n_x und K_x ein (HUGHES und KLOTZ, 1956).

Allgemein ergibt sich für $\bar{r}$ bei mehreren Sätzen bindender Gruppen (m) ein Gesamtdurchschnittswert aus der Summe der Einzeldurchschnittswerte von:

$$\bar{r} = \sum_{i=1}^m r_i \quad (X)$$

Gleichung V lautet dann:

$$\bar{r} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i \cdot k_i \cdot (M)}{1 + k_i \cdot (M)} \quad (XI)$$

oder:
$$\frac{\bar{r}}{(M)} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i \cdot k_i}{1 + k_i \cdot (M)} \quad (XII)$$

Für den Fall, daß die freie Konzentration der niedermolekularen Substanz (M) sich Null nähert, erhält man als Grenzwert:

$$\lim_{(M) \rightarrow 0} \frac{\bar{r}}{(M)} = \sum_{i=1}^m n_i \cdot k_i \quad (XIII)$$

Nähert sich die freie Konzentration einem unendlich großen Wert, so erreicht $\bar{r}$ als maximale Größe n:

$$\lim_{(M) \rightarrow \infty} \bar{r} = \sum_{i=1}^m n_i = n \quad (XIV)$$

Ziel der Bindungsversuche zwischen niedermolekularen Substanzen und Proteinen ist die Kenntnis der Kapazität und der Affinität des Proteins für diesen Stoff.

Erstere ist durch n , die maximale Anzahl kleiner Moleküle gegeben, die von einem Proteinmolekül gebunden werden kann. Letztere ist durch die Gesamtbindungskonstante gegeben.

Mit Hilfe der oben zitierten Gleichungen erhält man beide Größen, wenn man die freie und gebundene Konzentration der niedermolekularen Substanz kennt.

Zu diesem Zweck führt man Bindungsversuche durch, in denen man die Ausgangskonzentration des niedermolekularen Stoffs variiert und die gebundene Konzentration als Funktion der gemessenen freien Konzentration im Gleichgewicht bestimmt.

2. Methoden zur quantitativen Bestimmung der Proteinbindung

Die Gleichgewichtsdialyse ist eine der ältesten und auch heute noch häufig angewandten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Eiweißbindung niedermolekularer Substanzen. Sie beruht darauf, daß in einer eiweißhaltigen Lösung nur die ungebundenen Moleküle frei durch eine semipermeable Membran diffundieren können. Im Gleichgewicht ist die Konzentration der freien niedermolekularen Substanz auf beiden Seiten der Membran gleich. Die an Eiweiß gebundene Konzentration ergibt sich dann aus der Differenz der im Innern des Dialyseschlauchs gemessenen Gesamtkonzentration und der im Dialysat gemessenen freien Konzentration der Substanz.

Man kann die Methode sowohl in der Weise ausführen, daß sich die niedermolekulare Substanz zunächst mit der Proteinlösung innerhalb des Dialyseschlauchs befindet (DAVIS, 1942; KRIEGELSTEIN und KUSCHINSKY, 1968) als auch in umgekehrter Weise, so daß sie sich in der eiweißfreien Außenflüssigkeit befindet (DAVIS, 1943; KLOTZ, 1956).

Die Methode der Dialyse ist mit einigen Nachteilen behaftet:

- a) Da das Volumen der Außenflüssigkeit meist größer als das der eiweißhaltigen Lösung ist, wird die Konzentration der niedermolekularen Substanz ver-

dünnt; wegen des osmotischen Drucks der Proteine strömt Flüssigkeit in den Dialyseschlauch, und der Eiweißgehalt der Lösung wird gemindert.

- b) Viele niedermolekulare Stoffe werden an die Dialysemembran adsorbiert.
- c) Bei ionisierten Substanzen muß das Donnan-Gleichgewicht beachtet werden.
- d) Es wird eine verhältnismäßig lange Dialysezeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts benötigt (12 - 48 Stunden). Um diese Nachteile zu verringern, wurde von SCHOLTAN (1962) ein neues Dialysegerät entwickelt, welches vor allem eine kürzere Dialysezeit und konstante Flüssigkeitsvolumina ermöglicht.

Bei der Ultrafiltration (FLEXNER, 1937) wird die wässrige Phase mit dem freien Anteil der niedermolekularen Substanz mittels Überdruck durch die semipermeable Membran gepreßt. Hier tritt keine Verdünnung ein, sondern ein Konzentrationszuwachs durch Volumenabnahme im Dialyseschlauch. Auf Adsorption der Substanz an die Membran muß ebenfalls geachtet werden. Zudem kann es unter dem Druck zur Blockierung der Membranporen während der Filtration kommen. Die Methode wird häufig so angewandt, daß man den Druck durch Zentrifugieren erzielt (SOLOMON, 1967; BORGA, 1969).

Bei der Methode der Ultrazentrifugation wird der eiweißgebundene vom freien Anteil einer Substanz infolge ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt. Die freie Konzentration wird im Überstand bestimmt. Ist die Geschwindigkeit des Protein-Substanz-Komplexes von der des freien Proteins verschieden, kann das Gleichgewicht allerdings gestört werden (SCHOLTAN, 1965).

Nach SCHOLTAN, 1966, werden die Zentrifugenröhrchen in Kohlensäureschnee eingefroren, in Schichten zerlegt und die freie Konzentration in den oberen eiweißfreien Schichten bestimmt. Die Versuchsdauer dieser Methode entspricht der der Dialyse.

In Verteilungsversuchen wird die niedermolekulare Substanz zwischen der eiweißhaltigen wässrigen Phase und einer zweiten mit dieser nicht mischbaren Phase bis zur Gleichgewichtseinstellung verteilt. Zunächst bestimmt man das Konzentrationsverhältnis ohne Protein. Aus diesem und dem mit Protein gemessenen neuen Verhältnis zwischen den beiden Phasen ergibt sich die gebundene Konzentration (KARUSH, 1950 und 1951; GOODMAN, 1958).

Zu den neueren Methoden gehört die Gelfiltration mit Sephadex. Die niedermolekulare Substanz wird mit dem Eiweiß inkubiert und auf eine Sephadex G 25- oder G 50-Säule aufgetragen. Der freie Anteil dringt im Gleich-

gewicht in die Poren der Gelmatrix ein. Dadurch wird er aus der schneller wandernden Eiweißzone, mit der der gebundene Anteil wandert, herauschromatographiert. Im Elutionsdiagramm erreicht die Substanzkonzentration innerhalb der Eiweißzone 100 % der Ausgangskonzentration, fällt dann mit der Eiweißkonzentration ab bis auf einen konstanten Wert, den prozentualen Anteil (LEE und DEBRO, 1963). Wie bei der Ultrazentrifugemethode gilt auch bei der Gelfiltration, daß die Konzentration des freien Anteils nur dann der Gleichgewichtskonzentration entspricht, wenn der Komplex dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit hat wie das reine Protein. Die quantitative Auswertung der Gelfiltrationsversuche kann zudem erschwert werden, wenn Adsorption der niedermolekularen Substanz an Sephadex eintritt oder es zur Konkurrenz der Proteine und des Dextrangels um den Stoff kommt, wobei der Komplex z.T. wieder dissoziiert. Um dies weitgehend zu verhindern, müssen relativ große Volumina an Eiweißlösung verwendet werden.

Die Brauchbarkeit der Methode wurde von BARBER (1962) für verschiedene Pharmaka getestet. KRIEGERSTEIN und KUSCHINSKY (1968) verglichen die quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Phenothiazinen mittels Gelfiltration, Dialyse und Ultrazentrifugation und erhielten übereinstimmende Ergebnisse.

Alle Methoden werden heute häufig mit radioaktiv markierten niedermolekularen Substanzen ausgeführt, die eine genauere Messung der freien Konzentration erlauben.

Ein spezifischer Radioassay ist die von MURPHY (1967a, 1967b) für Steroide eingeführte "competitive protein binding analysis" (CPB). Bei dieser Methode beruht die Trennung des eiweißgebundenen vom freien Anteil auf der Adsorption des letzteren an unlösliche Substanzen wie Florisil, Fuller's earth. Das Bindungsgleichgewicht stellt sich in folgender Weise ein: Das Protein wird mit tracer (= radioaktiv markierte niedermolekulare Substanz) gerade gesättigt und in die Lösung der zu untersuchenden niedermolekularen Substanz gebracht. Zwischen markierter gebundener und unmarkierter freier Substanz stellt sich ein Gleichgewicht ein, wodurch der tracer z.T. vom Protein verdrängt wird. Gebundene und freie Fraktion werden getrennt und die Verteilung des tracers gemessen.

Für in Wasser nur gering lösliche polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe haben FRANKE und BÜCHNER (1967, 1968) eine Methode entwickelt, bei der die Solubilisierung der Kohlenwasserstoffe durch Albumin als Maß für ihre Proteinbindung verwendet wird. Um immer denselben Verteilungszustand des Kohlenwasserstoffs zu erzielen, wird er zunächst in hohem Überschuß auf einen inerten Träger (Sephadex G 25, Celite) gebracht. Dieser beladene Träger wird mit der Proteinlösung durch Schütteln (16 Stunden) äquilibriert. Überschüssigen Kohlenwasserstoff und Träger entfernt man durch Filtrieren. Die Konzentration an solubilisiertem Kohlenwasserstoff wird im Filtrat bestimmt.

3. Methoden zur Charakterisierung der Proteinbindung

Einen ersten Überblick über die Proteinbindung eines niedermolekularen Stoffs liefert der prozentuale Anteil α an freier bzw. β an gebundener Substanz unter Angabe der Gesamtkonzentration.

Da ein hoher β -Wert sowohl durch eine hohe Bindungskonstante mit wenig Bindungsstellen als auch durch eine kleine Bindungskonstante mit einer großen Anzahl Bindungsstellen verursacht sein kann, ist die Bestimmung dieser Größen erforderlich.

Nach der von KLOTZ (1946) abgeleiteten Gleichung VI trägt man das reziproke spezifische Bindungsvermögen ($\frac{1}{\bar{r}}$) gegen die reziproke freie Konzentration der niedermolekularen Substanz auf ($\frac{1}{M} = \frac{1}{c_f}$). Läßt sich die Proteinbindung durch eine einzige Gesamtbindungskonstante charakterisieren, deren Einzelbindungskonstanten gleich sind, so erhält man eine Gerade. Durch Extrapolation auf unendlich große freie Konzentration ($\frac{1}{c_f} = 0$) liefert ihr Ordinatenabschnitt die reziproke Anzahl der Bindungsstellen ($\frac{1}{n}$), ihre Steigung die reziproke Gesamtbindungskonstante ($\frac{1}{n \cdot k} = \frac{1}{K_1}$).

Bei dieser Darstellung wird mit den aus geringen Konzentrationen ermittelten Bindungswerten für $\bar{r}$ auf die Werte bei hohen Konzentrationen extrapoliert, ohne daß man das Ausmaß des zu extrapolierenden Bereichs über-

sehen kann. Deshalb sollte diese Darstellung nur dann angewendet werden, wenn die Bindungswerte eine baldige Sättigung des Proteins erkennen lassen.

Wenn dieses graphische Verfahren eine gekrümmte Linie liefert, kann zwar die Anzahl der Bindungsstellen noch abgelesen werden, nicht aber die Bindungskonstante.

SCATCHARD (1949) formte die Gleichung VI in Gleichung VII um. Danach trägt man den Quotienten $\frac{\bar{r}}{(M)} (= \frac{\bar{r}}{c_f})$ gegen das spezifische Bindungsvermögen auf und erhält wiederum eine Gerade, wenn nur eine Assoziationskonstante die Proteinbindung charakterisiert. Durch Extrapolation auf eine freie Konzentration von Null (Gl. XIII) liefert der Ordinatenabschnitt die Gesamtbindungskonstante ($n \cdot k = K_1$). Bei Extrapolation auf unendlich große freie Konzentration (Gl. XIV) liefert der Abszissenabschnitt die Anzahl der Bindungsstellen ($\bar{r} = n$).

Diese Darstellungsweise läßt sofort erkennen, wie groß der durch Extrapolation zu überbrückende Bereich ist. Auch bei gekrümmten Linien können die beiden Größen - wenn auch mit geringerer Genauigkeit - abgelesen werden.

3. Methoden zur Charakterisierung der Proteinbindung

Einen ersten Überblick über die Proteinbindung eines niedermolekularen Stoffs liefert der prozentuale Anteil α an freier bzw. β an gebundener Substanz unter Angabe der Gesamtkonzentration.

Da ein hoher β -Wert sowohl durch eine hohe Bindungskonstante mit wenig Bindungsstellen als auch durch eine kleine Bindungskonstante mit einer großen Anzahl Bindungsstellen verursacht sein kann, ist die Bestimmung dieser Größen erforderlich.

Nach der von KLOTZ (1946) abgeleiteten Gleichung VI trägt man das reziproke spezifische Bindungsvermögen ($\frac{1}{\bar{r}}$) gegen die reziproke freie Konzentration der niedermolekularen Substanz auf ($\frac{1}{M} = \frac{1}{c_f}$). Läßt sich die Proteinbindung durch eine einzige Gesamtbindungskonstante charakterisieren, deren Einzelbindungskonstanten gleich sind, so erhält man eine Gerade. Durch Extrapolation auf unendlich große freie Konzentration ($\frac{1}{c_f} = 0$) liefert ihr Ordinatenabschnitt die reziproke Anzahl der Bindungsstellen ($\frac{1}{n}$), ihre Steigung die reziproke Gesamtbindungskonstante ($\frac{1}{n \cdot k} = \frac{1}{K_1}$).

Bei dieser Darstellung wird mit den aus geringen Konzentrationen ermittelten Bindungswerten für $\bar{r}$ auf die Werte bei hohen Konzentrationen extrapoliert, ohne daß man das Ausmaß des zu extrapolierenden Bereichs über-

sehen kann. Deshalb sollte diese Darstellung nur dann angewendet werden, wenn die Bindungswerte eine baldige Sättigung des Proteins erkennen lassen.

Wenn dieses graphische Verfahren eine gekrümmte Linie liefert, kann zwar die Anzahl der Bindungsstellen noch abgelesen werden, nicht aber die Bindungskonstante.

SCATCHARD (1949) formte die Gleichung VI in Gleichung VII um. Danach trägt man den Quotienten $\frac{\bar{r}}{(M)} (= \frac{\bar{r}}{c_f})$ gegen das spezifische Bindungsvermögen auf und erhält wiederum eine Gerade, wenn nur eine Assoziationskonstante die Proteinbindung charakterisiert. Durch Extrapolation auf eine freie Konzentration von Null (Gl. XIII) liefert der Ordinatenabschnitt die Gesamtbindungskonstante ($n \cdot k = K_1$). Bei Extrapolation auf unendlich große freie Konzentration (Gl. XIV) liefert der Abszissenabschnitt die Anzahl der Bindungsstellen ($\bar{r} = n$).

Diese Darstellungsweise läßt sofort erkennen, wie groß der durch Extrapolation zu überbrückende Bereich ist. Auch bei gekrümmten Linien können die beiden Größen - wenn auch mit geringerer Genauigkeit - abgelesen werden.

Benutzt man die Gleichung VIII zur graphischen Darstellung, so trägt man den Quotienten $\frac{\bar{r}}{n-\bar{r}}$ gegen die freie Konzentration auf oder beider Logarithmen.

Liegt eine Bindungskonstante vor, erhält man eine Gerade, die durch den Ursprung geht und deren Steigung eine Einzelbindungskonstante ($k = \frac{K_1}{n}$) angibt.

Gilt die Voraussetzung, daß $\bar{r}$ gegenüber n klein ist, ($\bar{r} = \frac{1}{10} n$, SCHOLTAN, 1962), so kann die logarithmische Form der Gleichung VIII geschrieben werden:

$$\log \bar{r} \approx \log k + \log c_f$$

In der von WYMAN (1948) eingeführten Darstellungsweise nach der Gleichung $\frac{\bar{r}}{n-\bar{r}} = k_{app} \cdot (M)^m$ trägt man

den Logarithmus des Quotienten $\frac{\bar{r}}{n-\bar{r}}$ gegen den Logarithmus der freien Konzentration auf.

k_{app} wird als apparente Bindungskonstante der apparenten Reaktion $P + mM = PM_m$ aufgefaßt.

Nach SCHOLTAN (1962) kann die logarithmische Form der Gleichung von WYMAN unter der Voraussetzung, daß $\bar{r}$ gegenüber n klein ist und mit der Bezeichnung $k^* = k_{app} \cdot n$ geschrieben werden:

$$\log \bar{r} \approx \log k^* + m \cdot \log c_f$$

Danach trägt man den Logarithmus von $\bar{r}$ gegen den Logarithmus der freien Konzentration auf und erhält über einen großen Konzentrationsbereich selbst dann Geraden, wenn die Bindung durch mehrere Konstanten charakterisiert ist.

Bei Proteingemischen oder unbekannter Proteinkonzentration setzt man statt $\bar{r}$ die gebundene Konzentration der niedermolekularen Substanz ein:

$$\log c_g = \log k^* + m \cdot \log c_f$$

$$k^* = \frac{c_g}{c_f^m}$$

Der Ordinatenabschnitt liefert k^* , das ist die apparente Bindungskonstante für den untersuchten Konzentrationsbereich. Die Steigung m gibt das Verhältnis der aufeinanderfolgenden Bindungskonstanten an. Ist m kleiner als 1, so nehmen die Konstanten ab; ist m größer als 1, so nehmen sie zu; ist $m = 1$, so sind alle Konstanten gleich groß.

Nach SCHOLTAN (1964) erhält man eine der Gesamtbindungskonstanten proportionale Größe K nach der Gleichung:

$$\lim_{c_g \rightarrow 0} \frac{c_g}{c_f} = \sum_{i=1}^n \frac{n_i \cdot k_i \cdot c_p}{1 + c_g/c_p} = K$$

indem man den Quotienten aus der gebundenen und der freien Konzentration ($\frac{c_g}{c_f}$) gegen die gebundene Konzen-

tration aufträgt. Der Ordinatenabschnitt liefert die Größe K , die durch die molare Konzentration des Proteins dividiert wird und die Gesamtbindungskonstante K_1 ergibt.

Die gebräuchlichsten Darstellungsweisen sind die von SCATCHARD (1949) und SCHOLTAN (1962). Wenn die erwähnten Darstellungsweisen gekrümmte Linien liefern, genügt eine Gesamtbindungskonstante zur Charakterisierung der Proteinbindung der niedermolekularen Substanz nicht, oder es bestehen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den gebundenen kleinen Molekülen bzw. zwischen gebundenen und freien Molekülen (SCATCHARD, 1949).

4. Bindungsmechanismen

Der Mechanismus der Proteinbindung ist noch nicht vollständig geklärt.

Zu den möglichen Bindungsmechanismen gehören:

reine physikalische Adsorption, elektrostatische Anziehung ionisierter Substanzen durch geladene Gruppen am Proteinmolekül, Wasserstoffbrückenbindung (BRODIE, 1965) und hydrophobe Wechselbeziehung (NEMETHY, 1967). Der hydrophobe apolare Charakter der Eiweißbindung steht in neueren Untersuchungen im Vordergrund (HANSCH et al., 1965; BIRD und

MARSHALL, 1967; JARDETZKY, 1967; FRANKE, 1968;
SCHOLTAN, 1968), in denen ein Zusammenhang
zwischen der Lipoidlöslichkeit einer Substanz
und ihrer Eiweißbindung gefunden wurde.

III. METHODE UND EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Prinzip der Methode

Die Methode geht von dem physiko-chemischen Verhalten einer niedermolekularen Modellsubstanz in einer Proteinlösung aus, die Sephadexkugeln enthält.

Der niedermolekulare Stoff tritt mit dem Protein in Wechselbeziehung, dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Anteil ein. Läßt man nun soviele Sephadexkugeln in der Lösung quellen, daß deren Volumen gegenüber dem Gesamtvolumen der Lösung zu vernachlässigen ist, so diffundiert der freie Anteil in die Kugel, der proteingebundene Anteil bleibt mit dem Eiweiß ausgeschlossen.

Voraussetzung hierfür ist die Wahl eines Sephadextyps mit so enger Vernetzung, daß keine Proteinmoleküle eindringen können. Dieser Vorgang findet statistisch an jeder einzelnen Kugel des Dextrangels statt. Daher ist es möglich, Präparate herzustellen von der Größenordnung mikroskopischer Objekte und darin die Proteinbindung mikrophotometrisch zu bestimmen.

Die Schichtdicke der Küvetten (Objektträger mit Abstands- und Deckglas) wird nur um ein geringeres größer gewählt als der maximale Durchmesser der Kugeln.

Vergleicht man nun in der Küvette die Absorption über einer Kugel mit der Absorption der Umgebung, so ergibt sich die gemessene Extinktionsdifferenz

$$\Delta E = E_o - E_K \quad (1)$$

als Maß für den Anteil an proteingebundener Substanz (Abb. 1).

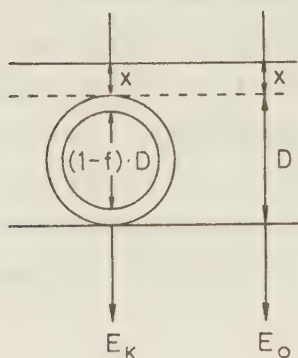


Abb. 1: Schema einer Sephadexkugel in der Mikroküvette

E_o = Extinktion der Umgebung

E_K = Extinktion der Kugel

Da die Extinktionen ($\epsilon \cdot x$) über der Kugel und der Umgebung identisch sind, gilt für die vom Kugeldurchmesser D unabhängige Extinktionsdifferenz

$$\frac{\Delta E}{D} = \frac{E_o}{D} - \frac{E_K}{D} \quad (2)$$

Dabei berechnet sich die Extinktion der Umgebung nach der Gleichung:

$$E_o = \epsilon \cdot c_o \cdot D \quad (3)$$

worin c_o die Ausgangskonzentration der niedermolekularen Substanz ist und ϵ ihr mittlerer molarer Extink-

tionskoeffizient. Dieser ist der - entsprechend der Proteinbindung - arithmetisch gemittelte Koeffizient aus dem in wässriger Lösung bestimmten "freien" Extinktionskoeffizienten ϵ_f und dem in Proteinklösung bestimmten "gebundenen" Extinktionskoeffizienten ϵ_g .

Die Extinktionsberechnung der Kugel erfordert einige Voraussetzungen.

Zunächst die Forderung der streng kugelförmigen Gestalt der Sephadexperlen. Diese wurde von BOGUTH und REPGES (1967) nachgewiesen.

Zum anderen steht dem freien Stoff zur Diffusion nicht das gesamte Kugelvolumen zur Verfügung, sondern ein um das Volumen der Gelmatrix kleineres "penetrierbares" Volumen. Dies ist je nach dem Sephadextyp verschieden. Da die Poren in der Kugel normalverteilt sind (BOGUTH et al., 1968) und der mittlere Porenquerschnitt sehr viel kleiner ist als der Querschnitt der auf der Kugel abgebildeten Photometerblende (s. Abschn. III.2.2.), ist das Volumen der Kugel repräsentiert durch die Schichtdicke. Diese setzt sich zusammen aus dem Anteil $f \cdot D$ durch die Gelmatrix und dem Anteil $(1-f) \cdot D$ durch das penetrierbare Volumen. Dieser Teil der Schichtdicke ist für die Extinktion der Kugel maßgebend.

Schließlich bietet die Gelmatrix als feste Phase in der Lösung eine nicht zu vernachlässigende Oberfläche zur Adsorption der niedermolekularen freien Substanz.

Berücksichtigt man diese Faktoren und die Tatsache, daß Sephadex im Spektralbereich von 700 - 250 nm keine störende Eigenextinktion hat (BOGUTH und REPGES, 1967), so gilt für die Extinktion der Kugel:

$$E_K = E_A + (1-f) \cdot E_F \quad (4)$$

worin E_A die der Adsorption zukommende Extinktion und E_F die Extinktion des freien Anteils bedeutet. Letztere berechnet sich nach der Gleichung:

$$E_F = \epsilon_f \cdot c_f \cdot D \quad (5)$$

mit der freien Stoffkonzentration c_f und dem "freien" Extinktionskoeffizienten ϵ_f .

Setzt man die Beziehungen 3, 4 und 5 in Gleichung 2 ein, erhält man für die Extinktionsdifferenz

$$\frac{\Delta E}{D} = \epsilon \cdot c_o - \frac{E_A}{D} - (1-f) \cdot \epsilon_f \cdot c_f \quad (6)$$

Um mit Hilfe dieser Beziehung die freie Stoffkonzentration c_f berechnen zu können, muß der Matrixanteil f der Kugel, die Adsorption der niedermolekularen Substanz an die Matrix und der mittlere molare Extinktionskoeffizient ermittelt werden.

2. Meßvorgang am Mikroskop - Photometer

2.1. Mikroskopische und photometrische Geräte

Es stand ein Mikroskop - Photometer (MPM Carl Zeiss) zur Verfügung mit folgenden Bauteilen:

Mikroskop: Photomikroskop (Carl Zeiss)

Photometer: Photometerkopf mit Photometerblenden 5 und 3,2 mm und Projektiven für 10- und 20-fache Vergrößerung für den sichtbaren Spektralbereich.

Empfängergehäuse mit Photomultiplier vom Typ EMI 6256 B.

Bei allen Messungen wurde folgende photometrische und mikroskopische Ausrüstung verwandt:

Photometer: Projektiv für 10-fache Vergrößerung
Blende 3,2 mm.

Mikroskop: Meßokular: Kpl 12,5 x W Pol
Objektiv: 6,3/0,16 Plan 160/-
Kondensor: Achromat 0,8
Leuchtfeldblende: 0,8
Interferenzfilter 620 nm und 489 nm
Verlauffilter - Monochromator (Verlauf-
linienfilter Veril S 200, Jenaer Glas-
werk Schott & Gen., Mainz).

Unter diesen Bedingungen sind Sephadexkugeln mit einem Durchmesser von 60 bis 85 μm messbar.

2.2. Auswahl der Meßbedingungen

Die Auswahl der Photometer- und Leuchtfeldblende ist für die Genauigkeit der photometrischen Messung von großer Bedeutung. Nur der in der Blende liegende Ausschnitt der in der Ebene der Photometerblende abgebildeten Kugel wird photometriert. Die Blende "schneidet" also - über dem Kugelscheitelpunkt eingestellt - einen Zylinder aus der Mitte der Kugel, dessen Höhe um so definierter ist, je kleiner sein Durchmesser gewählt wird. Darum wurde die kleinere Photometerblende (3,2 mm) gewählt.

Die Leuchtfeldblende wird in die Ebene der Photometerblende abgebildet und soll nicht viel größer als diese sein. Bei zu großer Leuchtfeldblende erhält man zuviel Streulicht und die Extinktion wird zu niedrig. Eine zu kleine Leuchtfeldblende leuchtet nicht das gesamte Feld aus, das der Photomultiplier mißt; die Extinktion wird zu groß.

Im allgemeinen fordert man den Durchmesser des Leuchtfeldes 1 1/2- bis 2-fach größer als den des Meßfeldes. Demnach sind für die Photometerblende 3,2 mm bei einer Vergrößerung von 6,3 die Leuchtfeldblenden von 0,7 bis 0,8 mm möglich, und es wurde daher die Blende 0,8 mm gewählt (Tab. 1).

Tabelle 1: Sephadex G 50 fine in Erythrosinlösung
($3 \cdot 10^{-3} \text{M}$)

Kugeldurchmesser 60,0 μm ,

Photometerblende 3,2 mm

<u>Leuchtfeldblende</u>	<u>Extinktionsdifferenz</u>
0,4	1,02
0,5	0,98
0,6	0,96
0,7	0,90
0,8	0,88
0,9	0,88
1,0	0,86

2.3. Meßvorgang

Der Meßvorgang bestand zunächst darin, mit dem Meßokular ohne Leuchtfeldblende und Filter den Durchmesser der Kugel zu bestimmen. Nach Umschalten des Strahlenteilersystems im Tubuskopf konnte die Kugel durch die Beobachtungslupe des Photometers beobachtet und die Photometerblende auf den Kugelscheitelpunkt eingestellt werden. Die Leuchtfeldblende wurde auf der Objektebene scharf abgebildet und zur Photometerblende zentriert. Der Verlauffilter-Monochromator wurde bis zur benötigten Wellenlänge in das Leuchtfeld geschoben.

Bei größerer Extinktion der Umgebung gegenüber der Kugel wurde der 100- Punkt über dem Kugelscheitelpunkt eingestellt und die Extinktionsdifferenz der Umgebung nach Verschieben des Objektes abgelesen. Bei größerer

Extinktion der Kugel gegenüber der Umgebung ging die Messung in umgekehrter Richtung vor sich.

2.4. Herstellung der Meßkammern

Die Meßkammern wurden jeweils am Tag vor der Verwendung in folgender Weise hergestellt:

Auf einem Objektträger wurde in einigem Abstand rechts und links je die Hälfte eines Deckglases (18 x 18) und darüber ein größeres Deckglas (28 x 32) mit wenig Entellan verkittet. Damit war die Kammerhöhe auf 0,17 mm festgelegt. Um diese Küvetten zu füllen, genügt eine Flüssigkeitsmenge von 50 - 100 μ l.

3. Bestimmung der Kugeleigenschaften von Sephadex

3.1. Beziehung zwischen der geometrischen Größe h, dem Brechungsindex und dem Matrixanteil

Es wurde Sephadex G 50 fine (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) gewählt mit einem Perldurchmesser von 20 - 80 μm und der Ausschlußgrenze $M = 30\,000$ für Peptide und globuläre Proteine. Die Quellzeit des Gels bei 24°C betrug in allen Versuchen drei Stunden.

Der Anteil $(1-f) \cdot D$ der Schichtdicke der Sephadexkugel, der für die Extinktion des freien Substanzanteils in der Kugel maßgebend ist, wurde interferenzmikroskopisch bestimmt.

Für interferenzoptisch zu messende Änderungen des Brechungsindex (Δn) gilt die Beziehung:

$$\Delta n \cdot l = z \cdot \lambda \quad (7)$$

$\Delta n \cdot l$ bedeutet die optische Weglänge durch das Medium, welches die Brechungsindexänderung hervorruft, z die Anzahl der versetzten Interferenzstreifen und λ die Wellenlänge des Lichts.

Beobachtet man eine Sephadexkugel im Interferenzmikroskop bei Interferenzkontrast (d.h. unendlicher Streifenbreite), so gilt für den Brechungsindex der Kugel (n_s) in einem Lösungsmittel (n_1) bei der Wellenlänge der grünen Hg-Linie:

$$(n_s - n_1) \cdot f \cdot D = z \cdot 0,546 \quad (8)$$

wobei $f \cdot D$ der Anteil der Schichtdicke einer Sephadex-Kugel bedeutet, welcher der Gelmatrix zukommt (siehe S. 21). Die zugehörige Dimension ist μm , weil die Wellenlänge ebenfalls in μm geschrieben wird.

Denkt man sich die Kugel senkrecht zur Durchstrahlungsrichtung in Scheiben gleicher Höhe h zerlegt, so daß h die der optischen Weglängendifferenz $= 1$ zugehörige Schichtdicke ist (Abb. 4), dann gilt nach Division durch $z \cdot h$:

$$(n_s - n_l) \cdot \frac{f \cdot D}{z \cdot h} = \frac{0,546}{h} \quad (9)$$

Da $z \cdot h$ gleich dem Durchmesser D der Kugel ist, folgt:

$$(n_s - n_l) \cdot \frac{f \cdot D}{D} = \frac{0,546}{h} \quad (10)$$

$$(n_s - n_l) \cdot f = \frac{0,546}{h} \quad (11)$$

$$f = \frac{0,546}{h} \cdot \frac{1}{n_s - n_l} \quad (12)$$

In dieser Gleichung müssen h und n_s bestimmt werden, um den Anteil f der Gelmatrix zu erhalten.

3.2. Bestimmung von h

Im Interferenzmikroskop mit angeschlossener Kamera (Leitz-Interferenzmikroskop, Mikro-Mach-Zehnder-Typ, S II) wurden bei unendlicher Streifenbreite und der Wellenlänge 546 nm die Bilder von gequollenen Sephadexkugeln photographiert (Abb. 2).



Abb. 2: Sephadexkugel in
Aqua dest.,
interferenzmikroskopische
Aufnahme bei unendlicher
Streifenbreite

h ist die geometrische Weglänge, die der Phasenverschiebung von einem λ entspricht.

Um festzustellen wieweit verschiedene Lösungsmittel den Quellungsgrad und damit die Größe von h beeinflussen können, wurden jeweils 10 Sephadexkugeln in destilliertem Wasser und in Kochsalzlösungen verschiedener Konzentrationen aufgenommen (Natriumchlorid zur Analyse, Riedel de Haen). Mit Hilfe eines Mikrodensitometers (Joyce-Loebl, England) wurden die hellen und dunklen Interferenzkreise der Aufnahmen auf einer Linie durch den Mittelpunkt abgetastet, die Schwärzung

auf Millimeterpapier graphisch dargestellt und die Radien der Maxima ermittelt (Abb. 3).

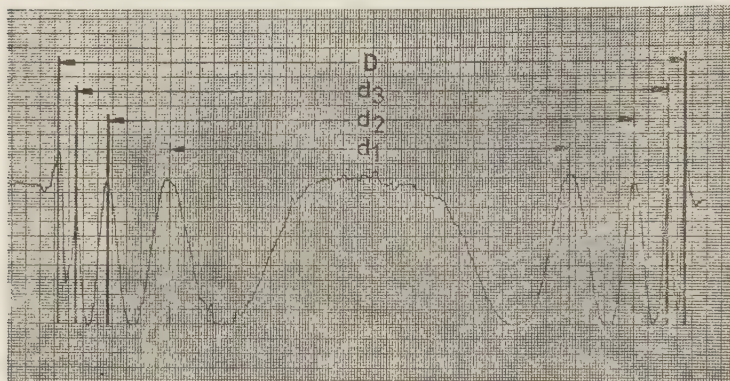


Abb. 3: Densitometrische Darstellung der Interferenzstreifen der in Abb. 2 gezeigten Sephadexkugel.

Für diese gelten nach Abb. 4 die Beziehungen:

$$R^2 - r_4^2 = h_o^2$$

$$R^2 - r_3^2 = (h_o + h)^2$$

$$R^2 - r_2^2 = (h_o + 2h)^2$$

$$R^2 - r_1^2 = (h_o + 3h)^2$$

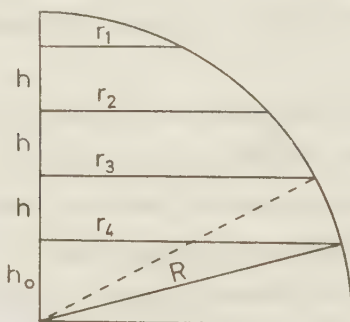


Abb. 4: Schema zur Berechnung von h

h berechnet sich dann aus den folgenden Gleichungen:

a) für Kugeln mit zwei Interferenzkreisen ist

$$h = -h_0 + \sqrt{h_0^2 + (R^2 - r_1^2 - h_0^2)} \quad (13)$$

b) für Kugeln mit drei Interferenzkreisen ist

$$h = \sqrt{\frac{(r_2^2 - r_1^2) - (r_3^2 - r_2^2)}{2}} \quad (14)$$

c) für Kugeln mit vier Interferenzkreisen ist

$$h = \sqrt{\frac{2 \cdot (r_2^2 - r_1^2) - (r_4^2 - r_2^2)}{6}} \quad (15)$$

Die Mittelwerte und Standardabweichungen von h, gemessen in μm , wurden an jeweils 10 Kugeln in den verschiedenen Lösungsmitteln berechnet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen von h bei verschiedenen Lösungsmitteln

	A.dest.	NaCl		
		2,5 %	5,0 %	10,0 %
h (in μm)	13,52	14,63	14,78	16,47
s + ./. (in % vom Mittelwert)	1,50	1,61	1,29	2,70

3.3. Bestimmung von n_s und f

Die Brechzahl von Sephadex (n_s) wurde interferenz- und phasenkontrastmikroskopisch in verschiedenen Lösungsmitteln mit bekanntem Brechungsindex (n_l) bestimmt.

Ist n_l größer als n_s , so werden Interferenzstreifen bei endlicher Streifenbreite in eine Richtung abgelenkt, im Phasenkontrast erscheint ein dunkler Halo außerhalb, ein heller Halo innerhalb der Kugelkontur. Dies war der Fall für Sephadexkugeln in Chlorbenzol.

Ist n_l kleiner als n_s , werden die Interferenzstreifen in die entgegengesetzte Richtung abgelenkt, im Phasenkontrast erscheint ein heller Halo außerhalb, ein dunkler Halo innerhalb der Kugelkontur. Dies war der Fall für Sephadexkugeln in Benzol.

Nähert man n_l und n_s , so verschwinden Interferenzstreifenversetzung und Phasenkontrast der Sephadexkugeln.

Um dies zu erreichen, wurden Chlorbenzol und Benzol zu verschiedenen Anteilen gemischt. Die Brechung derjenigen Mischung, die dem Brechungsindex von Sephadex G 50 fine entsprach, wurde im Abbé-Refraktometer bei 24°C bestimmt.

Die Mischung von 100 ml Chlorbenzol mit einem Brechungsindex

$n_D^{20^\circ} = 1,525$ und 20 ml Benzol mit einem Brechungsindex

$n_D^{20^\circ} = 1,501$ entsprach der Brechzahl von Sephadex.

Im Abbé-Refraktometer wurde für diese Lösung bei 24°C und damit für $n_{sD}^{24^\circ}$ die Brechzahl mit 1,5186 bestimmt.

Die für h und n_s ermittelten Werte wurden in Gleichung 12 eingesetzt und ergaben den Anteil f der Gelmatrix.

Der Mittelwert für f der vier Lösungen beträgt 0,208 mit einer Standardabweichung von 0,0091 = 4,4 %. Somit kann man von einer Beeinflussung der Quellung durch Konzentrationsunterschiede verschiedener Lösungsmittel absehen und für den penetrierbaren Volumenanteil rund 80 % annehmen, d.h. $1-f = 0,8$ (Tab. 3).

Tabelle 3: h , n und f von Sephadex G 50 fine in verschiedenen Lösungsmitteln

	A. dest.	NaCl		
		2,5 %	5,0 %	10,0 %
h	13,52	14,63	14,78	16,47
n	1,3340	1,3384	1,3426	1,3506
f	0,219	0,207	0,210	0,197

4. Bestimmung der Adsorption der niedermolekularen Substanz an Sephadex

4.1. Definition der Adsorption

Adsorption ist die reversible Anreicherung eines Stoffes an der Grenzfläche zweier Phasen. Sie tritt z.B. auf bei Berührung von Lösungen mit einer festen Phase, dem Adsorbens, und zwar um so leichter, je größer dessen Oberfläche ist. Für das Netzwerk der Dextramatrix von Sephadex ist daher durchaus eine Adsorption der gelösten niedermolekularen Substanz zu erwarten.

Geht man davon aus, daß einige wenige Sephadexkugeln das Gleichgewicht der Proteinbindung nicht beeinflussen, so kann die Adsorption an Sephadex in der Lösung ohne Protein im MPM bestimmt werden. In diesem Fall ergibt sich die Extinktionsdifferenz zwischen Kugel und Umgebung als Maß für die Adsorption an Sephadex.

Als Modell niedermolekularer Substanz dienten Farbstoffe in Pufferlösungen.

4.2. Probenansatz für die Adsorption

Zur Bestimmung der Adsorption an Sephadex wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Farbstoffs angesetzt, die einen möglichst großen Konzentrationsbereich - ausgedrückt in Mol/l - umfaßt. Nach Zugabe einer ge-

ringen Menge trockenen Sephadex G 50 fine ließ man die Farbstofflösungen bei 24°C drei Stunden stehen. In dieser Zeit ist das Gel gequollen, und das Adsorptionsgleichgewicht hat sich eingestellt. Im MPM wurde an jeweils 10 Kugeln jeder Konzentration bei der vorher bestimmten Wellenlänge des Farbstoffs die Extinktionsdifferenz (ΔE) zwischen Kugelscheitelpunkt und Umgebung gemessen und durch den dazugehörigen Kugeldurchmesser (in μm) dividiert ($\frac{\Delta E}{D}$).

4.3. Berechnung der Adsorptionkonstanten

Die Mittelwerte von je 10 Kugeln ($\overline{\frac{\Delta E}{D}}$) ergaben gegen die jeweilige Farbstoffkonzentration (c) graphisch aufgetragen die Adsorptionsisotherme für 24°C. Aus dem Verlauf der Isothermen, die sich einem Sättigungswert nähern (Abb. 10), konnte geschlossen werden, daß die Adsorption der benutzten Farbstoffe der Langmuir'schen Gleichung für Adsorptionsisothermen entsprach.

Demnach gilt für die Extinktion, die der Adsorption zukommt:

$$\frac{E_A}{D} = \frac{a \cdot c}{b + c} \quad (16)$$

Verfolgt man die Adsorption in der mit dem Farbstoff äquilibrierten Proteinlösung und setzt man voraus, daß das Ausmaß der Adsorption gegenüber der Protein-

bindung so klein ist, daß der freie Anteil dadurch nicht verändert wird, gilt für die Extinktion der Adsorption:

$$\frac{E_A}{D} = \frac{a \cdot c_f}{b + c_f} \quad (17)$$

Gleichung 6 lautet dann:

$$\frac{\Delta E}{D} = \xi \cdot c_o - \frac{a \cdot c_f}{b + c_f} - (1-f) \cdot \xi_f \cdot c_f \quad (18)$$

Die Konstanten a und b lassen sich aus der graphischen Darstellung der reziproken Werte von $\frac{\Delta E}{D}$ und c ermitteln, die einen geradlinigen Verlauf der Adsorptionsisothermen ergeben.

$$\frac{1}{E_A/D} = \frac{b}{a} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{a} \quad (19)$$

Der Ordinatenabschnitt ($\frac{1}{a}$) der berechneten Regressionsgeraden und ihre Steigung ($\frac{b}{a}$) liefern die Konstanten der Adsorption a und b (HIGGINS und RICHARDS, 1967).

5. Bestimmung der Proteinbindung

5.1. Absorptionsspektren der Farbstoffe in Proteinlösung

Da eine 4%ige Albuminlösung der Konzentration im Plasma entspricht und niedermolekulare körperfremde Stoffe im Blut an Albumin gebunden werden, wurde als Protein 4%iges Rinderserumalbumin ("reinst", Behringwerke) mit einem Molekulargewicht von 69.000 in Pufferlösung verwandt. Als Pufferlösung wurde Tris/HCl - Puffer, pH 7,36, verwandt, bestehend aus 0,2 molarer Trishydroxymethylaminomethan - Lösung (Boehringer) und 0,1 normaler Salzsäurelösung (Merck). Puffer und 4%ige Albuminlösung absorbieren Licht des sichtbaren Spektralbereichs nicht.

Es ist bekannt, daß das Absorptionsspektrum eines Stoffes durch die Proteinbindung verändert wird (RODKEY, 1961). Daher wurden im Spektralphotometer (Carl Zeiss, M4 G II) die Spektren der Farbstoffe bei gleicher Konzentration in Pufferlösung und in 4%iger Albuminlösung aufgenommen, die Absorptionsmaxima und die molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt (Tab. 4).

Tabelle 4: $\lambda_{\max}$ und ϵ der Farbstoffe in Puffer
und in 4%iger Albuminlösung
* ϵ_f und ϵ_g wurden bei der im MPM ver-
wandten Wellenlänge bestimmt

Farbstoff	$\lambda_{\max}$ (nm)		im MPM einge- stellte Wellen- länge	ϵ ($\text{Mol}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$)*	
	Puffer	Albumin		Puffer (ϵ_f)	Albumin (ϵ_g)
Erythrosin, bläulich (Kepec)	520	530	489	1,775	1,860
Chrysoin S 85 (Bayer)	430	430	430	5,42	4,73
Evans Blau (Merck)	610	620	620	7,758	7,161
Amaranth 85 (Bayer)	520	530	525	2,74	1,94
Orange GGN 70 (Bayer)	480	480	480	2,24	1,67

Bei Verschiebungen des Absorptionsspektrums wurde die Wellenlänge für das MPM gewählt, bei der beide Lösungen des Farbstoffs noch möglichst nahe ihrem Maximum liegen (Abb. 5 - 9).

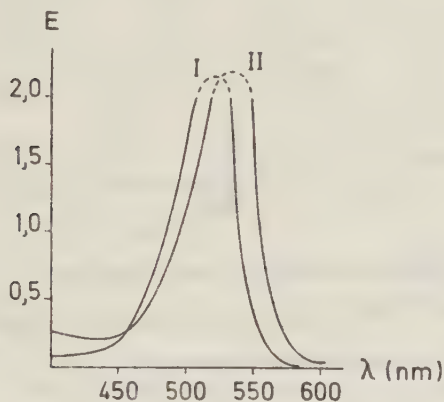


Abb. 5: Absorptionsspektrum von Erythrosin ($2 \cdot 10^{-5}$ M/l) in Pufferlösung (I) und in 4 %-iger Albuminlösung (II)

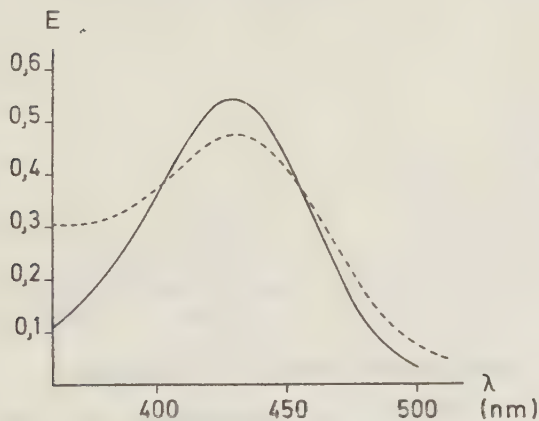


Abb. 6: Absorptionsspektrum von Chrysoin ($1 \cdot 10^{-5}$ M/l) in Pufferlösung (—) und in 4 %-iger Albuminlösung (---)

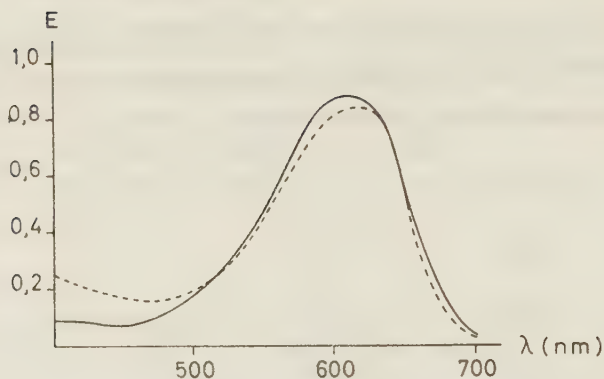


Abb. 7: Absorptionsspektrum von Evans Blau
($1 \cdot 10^{-5}$ M/l) in Pufferlösung (—) und
in 4 %-iger Albuminlösung (---)

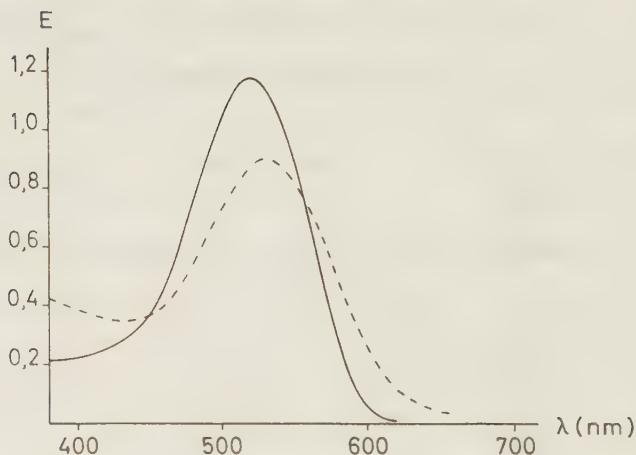


Abb. 8: Absorptionsspektrum von Amaranth
($5 \cdot 10^{-5}$ M/l) in Pufferlösung (—) und
in 4 %-iger Albuminlösung (---)

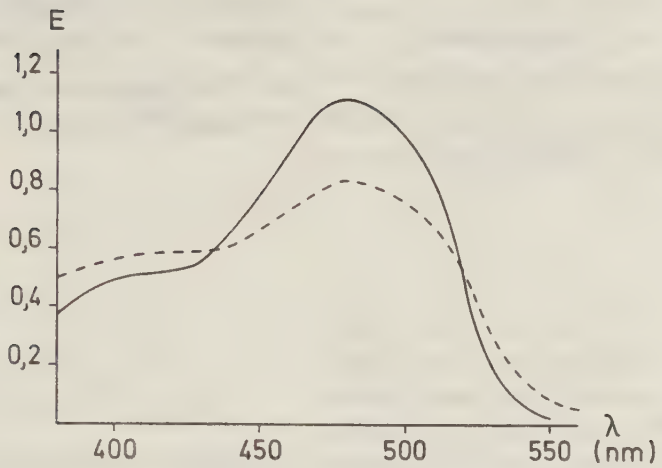
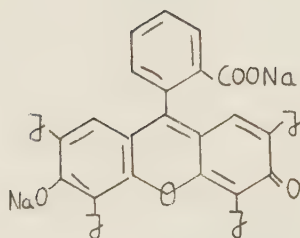
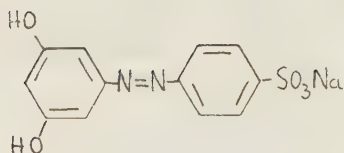


Abb. 9: Absorptionsspektrum von Orange
($5 \cdot 10^{-5}$ M/l) in Pufferlösung (—) und
in 4 %-iger Albuminlösung (---)



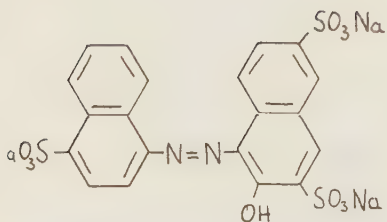
Erythrosin = Tetraiodfluorescein = C-Rot 38

MG: 880 (wegen des Wassergehaltes MG: 900)



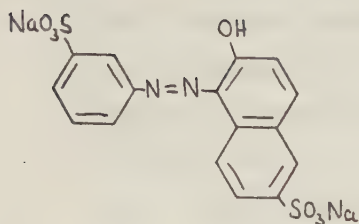
Chrysoin = Tropäolin O = L-Gelb 4 = 1-Aminobenzol-4-sulfosäure $\longrightarrow$ 1,3-Dioxybenzol (Natriumsalz)

MG 316 (wegen des Wassergehaltes MG: 363)



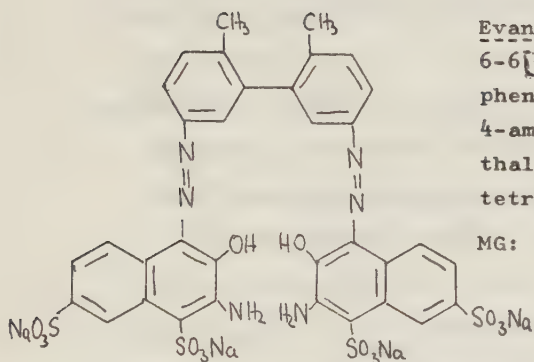
Amarant = Naphtholrot S = L-Rot 3 = Naphthionsäure-azo-2-Naphthol-3,6-disulfonsaures Natrium

MG: 604,5



Orange GGN = L-Orange 1 =
1-Aminobenzol-3-sulfosäure
→ 2-Oxynaphthalin-
6-sulfosäure (Natriumsalz)

MG: 452 (wegen des Wasser-
gehaltes MG: 645,7)



Evans Blau = T-1824 =
6-6'[(3,3-Dimethyl-4,4-Di-
phenyl)-bis-azo-] bis-
4-amino-5-hydroxy-Naph-
thalin-1,3-Disulfosäure)
tetra-Natriumsalz

MG: 960

5.2. Probenansatz für die Proteinbindung

Zur Bestimmung der Eiweißbindung wurde die Verdünnungsreihe der Farbstoffe in 5-facher Konzentration (0,25 ml) in 5 %-iger Albuminlösung (1ml) angesetzt. Nach Aequilibrierung (Dauer 15 min) wurde eine geringe Menge Sephadex zugegeben und die Quellungszeit bei 24°C abgewartet.

Bei jeweils 10 Kugeln jeder Konzentration wurde die Extinktionsdifferenz zwischen Kugelscheitelpunkt und Umgebung gemessen. Dabei kann - je nach der Farbstoffkonzentration - die Extinktion über der Kugel größer oder kleiner als die der Umgebung sein. Gemäß dem Ansatz der Gleichung 1 erhalten die durch den jeweiligen Kugeldurchmesser dividierten Meßwerte ein positives Vorzeichen bei größerer Extinktion der Umgebung, ein negatives Vorzeichen bei größerer Extinktion der Kugel. Die Mittelwerte $\frac{\overline{\Delta E}}{D}$ von 10 Kugeln jeder Konzentration wurden in die Gleichung zur Berechnung der freien Farbstoffkonzentration eingesetzt.

5.3. Berechnung der freien Farbstoffkonzentration

Gleichung 18 ist eine gemischtquadratische Gleichung, die nach c_f , der freien Farbstoffkonzentration, aufgelöst wird.

$$\frac{\Delta E}{D} - \varepsilon \cdot c_o = - \frac{a \cdot c_f}{b + c_f} - 0,8 \cdot \varepsilon_f \cdot c_f \quad (20)$$

$$\underbrace{\varepsilon \cdot c_o - \frac{\Delta E}{D}}_M = \frac{a \cdot c_f}{b + c_f} + 0,8 \cdot \varepsilon_f \cdot c_f \quad (21)$$

$$M \cdot b + M \cdot c_f = a \cdot c_f + 0,8 \cdot \varepsilon_f \cdot c_f \cdot b + 0,8 \cdot \varepsilon_f \cdot c_f^2 \quad (22)$$

$$0,8 \cdot \varepsilon_f \cdot c_f^2 + 0,8 \cdot \varepsilon_f \cdot c_f \cdot b + a \cdot c_f - M \cdot c_f = M \cdot b \quad (23)$$

$$c_f^2 + b \cdot c_f + \frac{a}{0,8 \cdot \varepsilon_f} \cdot c_f - \frac{M}{0,8 \cdot \varepsilon_f} \cdot c_f = \frac{M \cdot b}{0,8 \cdot \varepsilon_f} \quad (24)$$

$$c_f^2 + \underbrace{\left(b + \frac{a}{0,8 \cdot \varepsilon_f} - \frac{M}{0,8 \cdot \varepsilon_f} \right)}_N \cdot c_f = \frac{M \cdot b}{0,8 \cdot \varepsilon_f} \quad (25)$$

$$c_f = - \frac{N}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{N}{2} \right)^2 + \frac{M \cdot b}{0,8 \cdot \varepsilon_f}} \quad (26)$$

Nur der positive Wert der Wurzel ergibt eine positive Konzentration.

Da die Gesamtkonzentration c_o des Farbstoffs gleich der Summe aus den Konzentrationen c_f an freiem und c_g an gebundenem Farbstoff ist, gilt für den prozentualen Anteil α an freiem Farbstoff:

$$\alpha = \frac{100 \cdot c_f}{c_g} \quad (27)$$

und für den prozentualen Anteil β an gebundenem Farbstoff:

$$\beta = 100 - \alpha \quad (28)$$

Als erste Näherung erhält man die freie Farbstoffkonzentration, wenn man für den mittleren molaren Extinktionskoeffizienten der Umgebung ξ (enthalten in M der Gleichung 21) zunächst den molaren Extinktionskoeffizienten ξ_f des freien Farbstoffs einsetzt. Mit diesem Ergebnis ermittelt man ξ nach der Gleichung:

$$\xi = \frac{\alpha}{100} \cdot c_f + \frac{\beta}{100} \cdot c_g \quad (29)$$

Mit diesem ξ erhält man als zweite Näherung einen besseren Wert für c_f und wiederholt diesen iterativen Rechengang solange, bis sich das Ergebnis nicht mehr verändert.

IV. ERGEBNISSE

1. Adsorption der Farbstoffe an Sephadex

Die Farbstoffe Erythrosin, Chrysoin, Evans Blau, Amaranth und Orange werden bei 24°C in Tris/HCl-Pufferlösung in verschiedenem Ausmaß an Sephadex adsorbiert. Bei allen läßt sich im gemessenen Konzentrationsbereich, wie Abb. 10 zeigt, die Adsorption durch die Langmuir'sche Adsorptionsgleichung (Gl. 16 und 19) beschreiben und die Konstanten daraus berechnen. Danach wird um so mehr Farbstoff adsorbiert, je größer a und je kleiner b ist, wobei die Konstante a im Produkt mehr ins Gewicht fällt als b in der Summe.

Tab. 5 und Abb. 10 weisen Evans Blau als den am stärksten adsorbierten Farbstoff aus, gefolgt von Erythrosin, Chrysoin, Amaranth und Orange.

Um die Abhängigkeit der Adsorption von der Menge an Sephadex zu prüfen, wurde die gleiche Verdünnungsreihe von Erythrosin jeweils mit 3, 6 und 12 mg Sephadex versetzt. Wie Abb. 11 zeigt, sind die beiden Parameter der Regressionsgeraden Steigung und Ordinatenabschnitt identisch. Daher besteht im Bereich von 3 - 12 mg Sephadex keine Abhängigkeit zwischen der Ausgangskonzentration und der adsorbierten Menge des Farbstoffs. Damit ist die Voraussetzung gegeben, daß das Ausmaß der Adsorption so gering ist, daß die Ausgangskonzentration nicht geändert wird.

Tab. 5: Adsorption der Farbstoffe an Sephadex G 50 f

Farbstoff	Regressionsgerade		Adsorptionskonstanten	
	y =	r	a	b
Evans Blau	$0,8517x + 88,51$	0,988	0,02261	0,00008
Erythrosin				
3mg Seph.	$0,155 x + 60,25$	0,998		
6mg Seph.	$0,152 x + 59,83$	0,997	0,01628	0,00246
12mg Seph.	$0,148 x + 64,18$	0,998		
Chrysoin	$0,1685x + 109,95$	0,990	0,00910	0,00151
Amaranth	$0,2518x + 149,87$	0,997	0,00667	0,00168
Orange	$0,3922x + 175,58$	0,997	0,00570	0,00221

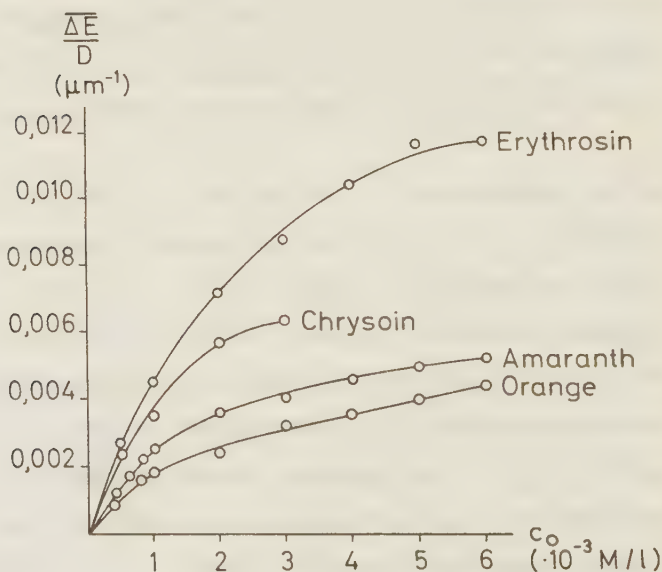


Abb. 10: Adsorptionsisothermen der Farbstoffe an Sephadex G 50 f bei 24°C

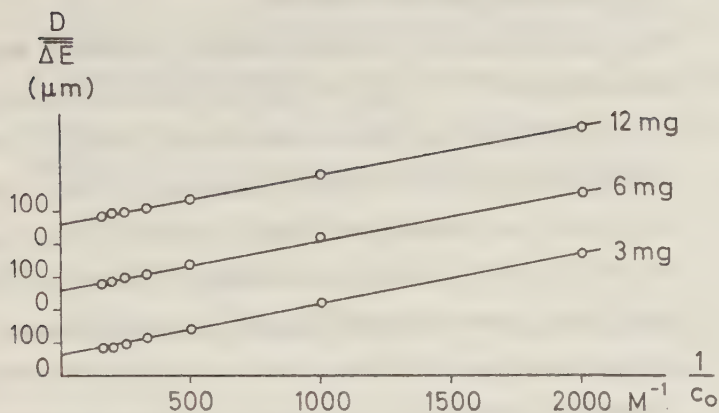


Abb. 11: Reziproke Adsorptionsisotherme von Erythrosin
an verschiedenen Mengen Sephadex G 50 f

2. Albuminbindung der Farbstoffe

Die Wechselwirkung von Erythrosin, Chrysoin, Amaranth und Orange mit 4 %-iger Rinderserumalbuminlösung wurde im gleichen Konzentrationsbereich bestimmt wie die Adsorption der Farbstoffe an Sephadex ($\sim 0,5 - 6 \cdot 10^{-3}$ M/l). Bei der Bindung von Evans-Blau konnte in dem zur Adsorption verwendeten Bereich ($0,5 - 20 \cdot 10^{-5}$ M/L) keine Extinktionsdifferenz gemessen werden. Daraus kann man schließen, daß bei diesen Konzentrationen die Albuminbindung und die Adsorption des Evans-Blau gleich sind. Die Eiweißbindung dieses Farbstoffes wurde bei Konzentrationen von $5 - 15 \cdot 10^{-4}$ M/l bestimmt.

Die Abbildungen 12, 19, 23, 24 und 26 zeigen die Abhängigkeit der Extinktionsdifferenz $\frac{\Delta E}{D}$ von der eingesetzten Gesamtkonzentration c_o des Farbstoffs sowohl für die Albuminbindung als auch für die Adsorption der Farbstoffe. Bei diesen Abbildungen darf man sich nicht durch das ohne Albumin bestimmte Ausmaß der Adsorption gegenüber der Albuminbindung irreführen lassen. In der Albuminlösung steht der Sephadexkugel nur der freie Anteil des Farbstoffs, nicht die Gesamtkonzentration zur Adsorption zur Verfügung. So verschiebt sich zum Beispiel für Erythrosin mit einem α -Wert von 14,2 % die Farbstoffkonzentration für die Adsorption von $5 \cdot 10^{-3}$ M/l auf $0,35 \cdot 10^{-3}$ M/l.

Aus den Tabellen 6 bis 11 ist die nach Gleichung 25 berechnete freie Konzentration c_f für die jeweilige Ausgangskonzentration der Farbstoffe, der prozentuale Anteil α an freiem bzw. β an gebundenem Farbstoff und das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ ersichtlich.

2.1. Erythrosin

Die flach ansteigende Kurve der Albuminbindung von Erythrosin (Abb. 12) nähert sich einem Grenzwert. Demnach wird mit steigender Gesamtkonzentration mehr Erythrosin gebunden, wobei nahezu Sättigung des Albumins mit Farbstoff erreicht wird.

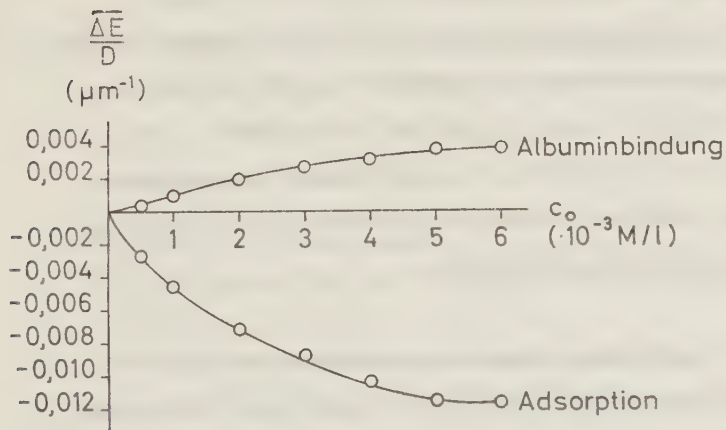


Abb. 12: Erythrosin - Adsorption und Albuminbindung

2.1.1. Prozentualer Anteil α bzw. β an freiem bzw.
----- gebundenem Erythrosin -----

Die β -Werte (Tab. 6a) zeigen keine deutliche Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration von Erythrosin, so daß der prozentuale Anteil an gebundenem Erythrosin im gemessenen Konzentrationsbereich 85,80 % beträgt. Das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ nimmt mit steigender Erythrosin-Gesamtkonzentration von 0,8 bis 8,3 zu (Tab. 6a).

Im Gegensatz zur geringen Abhängigkeit des gebundenen Erythrosinanteils von der Gesamtkonzentration zeigt Abb. 13 eine starke Abhängigkeit des β -Wertes von der Albuminkonzentration. Der β -Wert einer Erythrosinkonzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ M/l steigt bei Erhöhung der Albuminkonzentration von 0,5 g/100 ml (= 0,072 mM/l) auf 4 g/100 ml (= 0,58 mM/l) von 27,91 auf 86,52 % an. Das spezifische Bindungsvermögen nimmt mit steigender Albuminkonzentration von 11,6 auf 4,5 ab (Tab. 6b).

Die β -Werte einer Erythrosinkonzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ M/l zeigen im Bereich von pH 7,0 - 8,4 keine Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

Zur Überprüfung des α -Wertes von Erythrosin wurde eine Konzentration von $3,2 \cdot 10^{-4}$ M/l Erythrosin in 2 %-iger Albuminlösung in der analytischen Ultrazentrifuge (luftgetriebene PHY WE Ultrazentrifuge U 50 L solange beobachtet, bis das Albumin vollstän-

dig sedimentiert war. Für den Anteil an freiem Erythrosin ergab sich ein α -Wert von 16,26 %.

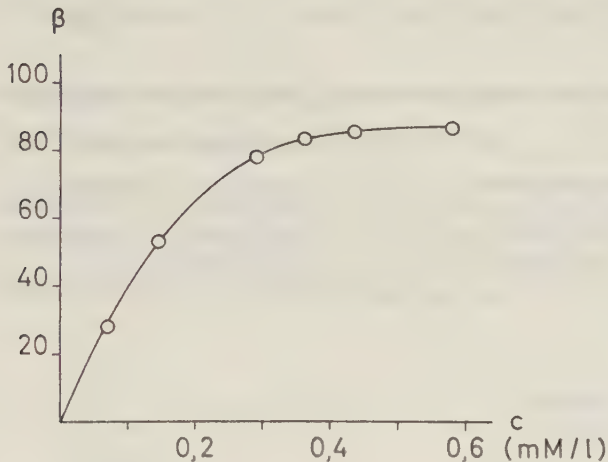


Abb. 13: Abhängigkeit der Bindung von Erythrosin ($3 \cdot 10^{-3}$ M/l) von der Albuminkonzentration

2.1.2. Gesamtbindungskonstante K_1 , Anzahl n der
----- Bindungsstellen und freie Reaktionsenergie

Zur eingehenderen Charakterisierung der Bindung von Erythrosin dienen verschiedene graphische Darstellungen.

- a) Trägt man den reziproken Wert des spezifischen Bindungsvermögens $\bar{r}$, welches die durchschnittlich pro Albuminmolekül gebundene Anzahl Farbstoffmoleküle angibt, gegen die reziproke freie Erythrosinkonzentration auf, so erhält man eine Gerade. Da

bei unendlich großer freier Farbstoffkonzentration $\bar{r}$ gleich n der Anzahl Bindungsstellen am Albuminmolekül ist, erhält man nach der Gleichung

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{n \cdot k} \cdot \frac{1}{c_f} + \frac{1}{n} \quad (30)$$

aus dem Ordinatenabschnitt $\frac{1}{n}$ und aus der Steigung

$$\frac{1}{n \cdot k} = \frac{1}{K_1} \cdot k \quad \text{ist die Einzelbindungskonstante für}$$

jede Bindungsstelle, K_1 die sogenannte Gesamtbindingkonstante. Aus Abb. 14 läßt sich für Erythrosin

n mit 15,38 und K_1 mit $1,587 \cdot 10^4$ l/M bestimmen.

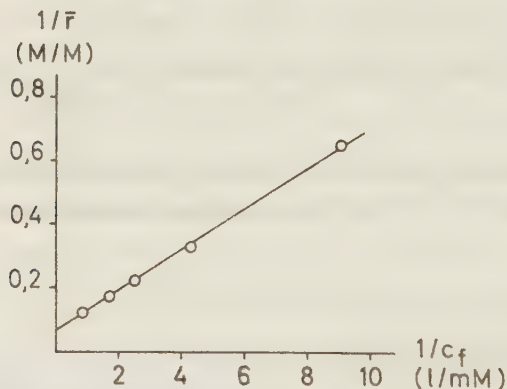


Abb. 14: Erythrosin - Abhängigkeit des reziproken spezifischen Bindungsvermögens von der reziproken freien Farbstoffkonzentration (Regressionsgerade : $y = 0,061x + 0,065$
 $r = 0,9995$)

b) Trägt man nach der Gleichung

$$\frac{\bar{r}}{n - \bar{r}} = k \cdot c_f \quad (31)$$

den Quotienten $\frac{\bar{r}}{n - \bar{r}}$ gegen die freie Erythrosin-

konzentration auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung $k = \frac{K_1}{n}$.

Demnach ist die Bindung von Erythrosin nur durch eine Gesamtbindungskonstante charakterisiert, die sich aus Abb. 15 mit $1,568 \cdot 10^4$ l/M ergibt.

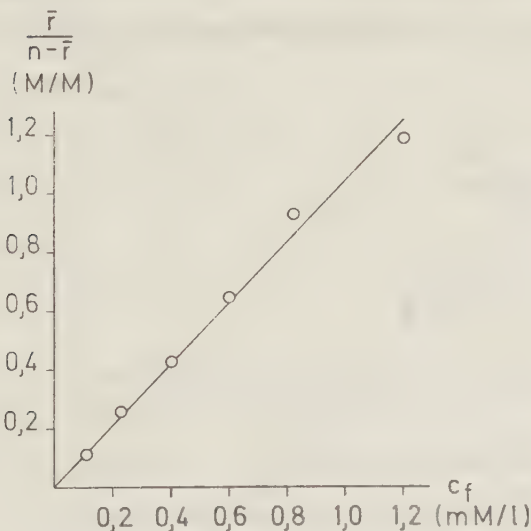


Abb. 15: Erythrosin - Abhängigkeit des Quotienten

$\frac{\bar{r}}{n - \bar{r}}$ von der freien Farbstoffkonzentration

(Regressionsgerade: $y = 1,0197x$

$r = 0,9977$)

c) Die Bindungskonstante läßt sich auch aus der Darstellung von SCATCHARD (1949) bestimmen, in der der Quotient $\frac{\bar{r}}{c_f}$ in l/M gegen das spezifische Bindungsvermögen in M/M aufgetragen wird, nach der Gleichung

$$\frac{\bar{r}}{c_f} = K (n - \bar{r}) \quad (32)$$

Diese Darstellung liefert für Erythrosin ebenfalls eine Gerade, so daß nur ein Satz von n bindenden Gruppen mit einer Gesamtbindungskonstante K_1 die Albuminbindung von Erythrosin charakterisiert.

Der Ordinatenabschnitt $1,588 \cdot 10^4$ l/M der Abb. 16 ist gleich K_1 , der Abszissenabschnitt 15,31 ist gleich n.

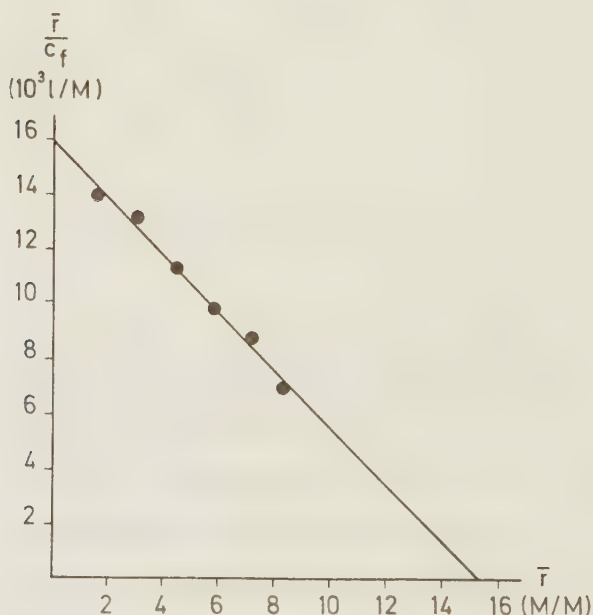


Abb. 16: Erythrosin: Abhängigkeit des Quotienten $\frac{\bar{r}}{c_f}$ vom spezifischen Bindungsvermögen
(Regressionsgerade: $y = 0,1037x + 1,588$
 $r = 0,9914$)

- d) Eine der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K erhält man aus einer Darstellung, in der man den Quotienten $\frac{c_g}{c_f}$ gegen die gebundene Erythrosinkonzentration aufträgt. Dividiert man den Ordinateabschnitt K durch die molare Konzentration des Albumin, erhält man die Gesamtbindungskonstante K_1 .

Für Erythrosin in 0,00058 molearer Albuminlösung ergibt sich nach Abb. 17 K mit 9,2 und K_1 mit $1,586 \cdot 10^4$ l/M.

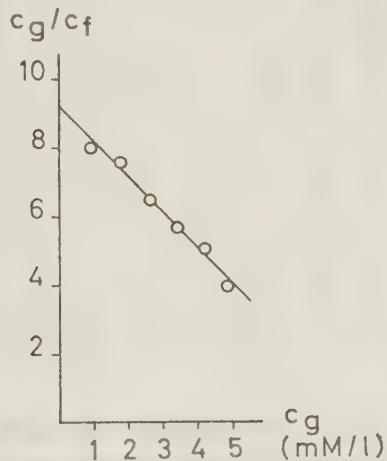


Abb. 17: Erythrosin - Abhängigkeit des Quotienten $\frac{c_g}{c_f}$ von der gebundenen Farbstoffkonzentration.

Die oben aufgeführten Darstellungsmethoden liefern gut übereinstimmende Ergebnisse.

- e) Die von SCHOLTAN eingeführte Darstellung der Meßergebnisse als Geraden im doppelt-logarithmischen System, die als Voraussetzung verlangt, daß $\bar{r}$ gegenüber n klein ist, kann dagegen für Erythrosin - mit $\bar{r}$ -Werten von 0,75 bis 8,27 und einem n von 15 - nur eine gekrümmte Linie liefern (Abb. 18).

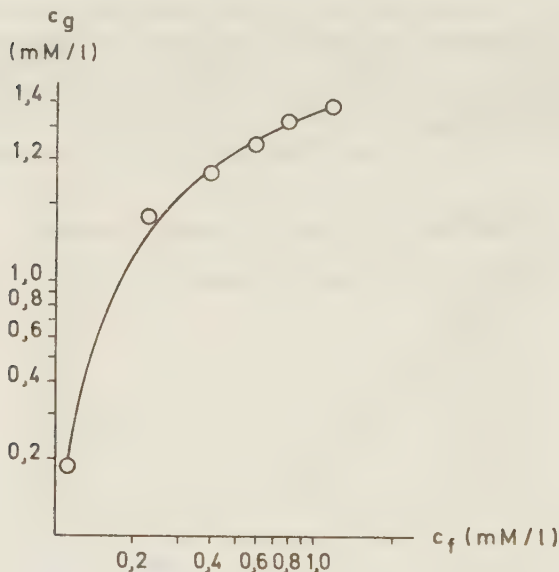


Abb. 18: Erythrosin - Abhängigkeit der gebundenen von der freien Farbstoffkonzentration im doppelt-logarithmischen System.

Aus der Gesamtbindungskonstanten K_1 kann man als Maß für die Affinität der Bindung die freie Reaktionsenergie nach der Beziehung $\Delta F^0 = - RT \ln K_1$ berechnen. Für die Albuminbindung von Erythrosin bei 24°C mit $K_1 = 1,588 \cdot 10^4 \text{ l/M}$ erhält man eine freie Reaktionsenergie von $\Delta F^0 = - 5750 \text{ cal/Mol}$.

Tabelle 6a: Bindung von Erythrosin an 4%ige Albuminlösung
(alle Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

c_o (M/l)	1. Näherung mit $\varepsilon = \varepsilon_f = 1,775$		2. Näherung mit $\varepsilon = 1,849$		3. Näherung mit $\varepsilon = 1,848$		3. Näherung C_f (M/l)	$\frac{M}{r}$
	α	β	α	β	α	β		
0,0005	13,84	86,16	12,06	87,94	12,05	87,95	0,0000602	0,7583
0,001	10,06	89,94	11,01	88,99	11,05	88,95	0,0001104	1,5338
0,002	10,56	89,44	11,63	88,37	11,62	88,38	0,0002320	3,0483
0,003	12,14	87,86	13,30	86,70	13,29	86,71	0,0003988	4,4848
0,004	13,67	86,33	14,96	85,04	14,94	85,06	0,0005974	5,8666
0,005	15,06	84,94	16,48	83,52	16,46	83,54	0,0008229	7,2019
0,006	18,38	81,62	20,02	79,98	20,00	80,00	0,00120015	8,2756
Mittelwerte:	13,39	86,61	14,21	85,79	14,20	85,80		

Tab. 6b: Bindung von Erythrosin ($3 \cdot 10^{-3} \text{M/l}$) an verschiedene Albuminkonzentrationen

Albuminkonzentration mg/100ml	3. Näherung		$\frac{\bar{r}}{r} \quad \frac{M}{M}$
	α	β	
0,5	72,09	27,91	11,62
1,0	46,92	53,08	10,99
2,0	21,92	78,08	8,08
2,5	16,55	83,45	6,91
3,0	14,56	85,44	5,89
4,0	13,48	86,52	4,48

2.2 Chrysoin

Die in Abb. 19 dargestellte Kurve der Albuminbindung von Chrysoin verläuft ähnlich der von Erythrosin. Mit steigender Gesamtkonzentration nimmt die Bindung zu und nähert sich einem Grenzwert. Die Gesamtkonzentration von Chrysoin ließ sich jedoch nicht bis zur Sättigung des Albumins erhöhen.

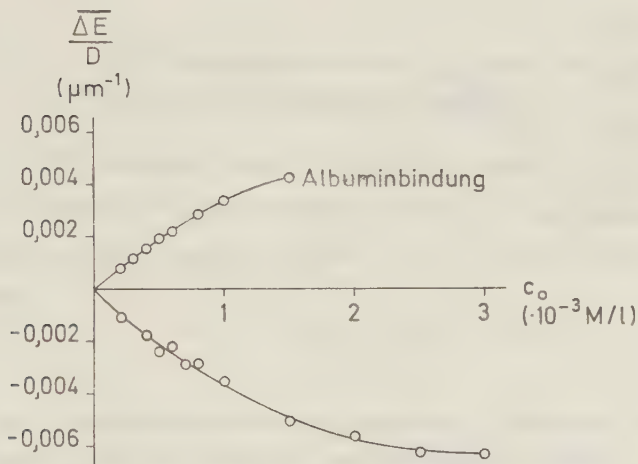


Abb. 19: Chrysoin - Adsorption und Albuminbindung

2.2.1. Prozentualer Anteil α bzw. β an freiem bzw. gebundenem Chrysoin

Die β -Werte von Chrysoin sind denen von Erythrosin vergleichbar, zeigen jedoch eine gewisse Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration. In den ersten 5 Konzentrationen (von 2 bis $6 \cdot 10^{-4} \text{ M/l}$) bleiben sie konstant, während sie bis $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M/l}$ um 13 % abnehmen (Tab. 7a).

Die Abhängigkeit von der Albuminkonzentration ist bedeutend stärker als die Abhängigkeit von der Chrysoin-Gesamtkonzentration.

Der β -Wert einer Chrysoinkonzentration von $8 \cdot 10^{-4}$ M/l steigt mit Erhöhung der Albuminkonzentration von 0,5 g/100 ml auf 4 g/100 ml von 36,3 % auf 85,5 % (Abb. 20).

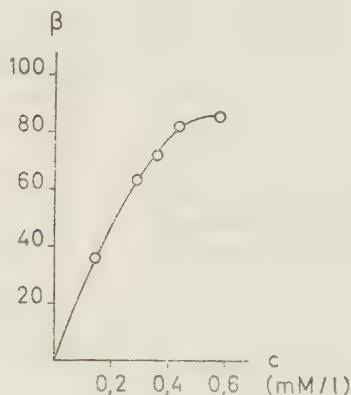


Abb. 20: Chrysoin - Abhängigkeit des prozentualen Anteils β an gebundenem Chrysoin von der Albuminkonzentration.

In einem p_H -Bereich von 6,5 bis 8,5 besteht keine Abhängigkeit der Albuminbindung des Chrysoin von der Wasserstoffionenkonzentration. Der mittlere β -Wert einer Chrysoinkonzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ M/l beträgt bei 5 verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen 79,6 % mit einer Standardabweichung von $\pm 5,36$ %.

Das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ nimmt mit steigender Chrysoin-Gesamtkonzentration von 0,3 bis 2,0 zu (Tab. 7a). Da noch keine Sättigung des Albumin erreicht ist, können wahrscheinlich mehr als 2 Moleküle Chrysoin von einem Albuminmolekül gebunden werden. Mit steigender Albuminkonzentration nehmen die $\bar{r}$ -Werte ab (Tab. 7b).

2.2.2. Gesamtbindungskonstante K_1 , Anzahl der Bindungsstellen, freie Reaktionsenergie

Über die maximale Anzahl Farbstoffmoleküle, die von einem Albuminmolekül gebunden werden und die gleich der Anzahl n der Bindungsstellen ist, gibt Abb. 21 Auskunft.

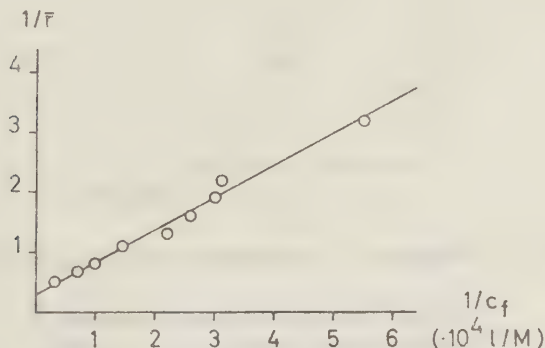


Abb. 21: Chrysoin - Abhängigkeit des reziproken spezifischen Bindungsvermögens von der reziproken freien Farbstoffkonzentration

(Regressionsgerade: $y = 0,5381x + 0,2968$
 $r = 0,9923$)

Da diese Darstellung für Chrysoin eine Gerade ergibt, läßt sich die Albuminbindung dieses Farbstoffes durch einen Satz bindender Gruppen mit einer Gesamtbindungskonstanten K_1 ausdrücken.

Aus der Regressionsgeraden der Abb. 12 berechnet sich n für Chrysoin mit 3,37 und K_1 mit $1,858 \cdot 10^4$ l/M.

Die Darstellung nach SCATCHARD liefert für n einen Wert von 3,1 und für K_1 von $1,865 \cdot 10^4$ l/M (Abb. 22).

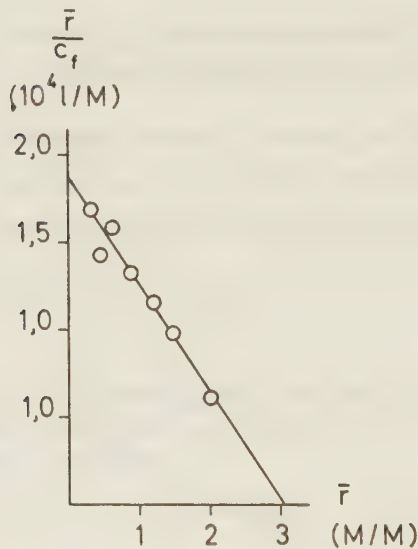


Abb. 22: Chrysoin - Abhängigkeit des Quotienten $\frac{\bar{r}}{c_f}$ vom

spezifischen Bindungsvermögen $\bar{r}$

(Regressionsgerade: $y = 0,606x + 1,865$

$r = 0,977$)

Da das spezifische Bindungsvermögen mit Werten von 0,3 bis 2,0 gegenüber der Anzahl von 3,4 Bindungsstellen nicht zu vernachlässigen ist, liefert die Darstellung nach SCHOLTAN auch für Chrysoin eine gekrümmte Linie.

Die aus der Gesamtbindungskonstanten K_1 (Mittelwert der beiden Darstellungen = 1,862) berechnete freie Reaktionsenergie beträgt für Chrysoin - 5842 cal/Mol.

Tab. 7a: Bindung von Chrysoin an 4%ige Albuminlösung

* ξ wurde für jede Konzentration getrennt berechnet

$c_o (M/l)$	1. Näherung mit $\xi = \xi_f$		2. Näherung		3. Näherung		4. Näherung		4. Näherung $c_f M/l$	$\bar{r}(M/M)$
	α	β	* α	β	* α	β	* α	β		
0,0002	15,35	84,65	9,57	90,43	9,16	90,84	9,15	90,85	0,0000183	0,31
0,0003	16,89	83,11	11,14	88,86	10,73	89,27	10,71	89,29	0,0000321	0,46
0,0004	15,94	84,06	10,15	89,85	9,75	90,25	9,72	90,28	0,0000389	0,62
0,0005	15,45	84,55	9,52	90,48	9,11	90,89	9,07	90,93	0,0000454	0,78
0,0006	17,65	82,35	11,76	88,24	11,33	88,67	11,50	88,50	0,0000690	0,92
0,0008	19,19	80,81	13,24	86,76	12,81	87,19	12,78	87,22	0,0001022	1,20
0,0010	21,32	78,68	15,33	84,67	14,88	85,12	14,86	85,14	0,0001486	1,47
0,0015	28,80	71,20	22,76	77,24	22,25	77,75	22,22	77,78	0,0003330	2,01

Tab. 7b: Bindung von Chrysoin (8.10^{-4} M/l) an verschiedene Albuminkonzentrationen

Albuminkonzentration mg/100ml	4. Näherung		$\frac{\bar{r}}{r}$ $\frac{\bar{M}}{M}$
	α	β	
1,0	63,71	36,29	2,00
2,0	36,92	63,08	1,74
2,5	28,01	71,99	1,59
3,0	18,10	81,90	1,51
4,0	14,47	85,53	1,18

2.3. Evans Blau

Die in Abb. 23 dargestellte Beziehung zwischen den Meßwerten der Albuminbindung und der Gesamtkonzentration von Evans Blau zeigt einen linearen Verlauf. Demnach wird der gesamte zugefügte Farbstoff an Albumin gebunden, ohne Sättigung zu erreichen.

Die im Konzentrationsbereich von 5 bis $15 \cdot 10^{-4}$ M/l bestimmten α - und β -Werte sind unabhängig von der Gesamtkonzentration (Tab. 8 und 9). Somit ergibt sich der Anteil an gebundenem Evans Blau zu 99,87 % in 4 %-iger Albuminlösung und zu 99,19 % in 1 %-iger Albuminlösung.

Das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ steigt von 0,85 auf 2,58 in 4 %-iger Albuminlösung. In 1 %-iger Albuminlösung ist es größer und steigt von 2,72 auf 6,84.

Wegen der äußerst geringen Konzentrationen des freien Farbstoffs lassen sich die Meßergebnisse von Evans Blau nicht graphisch darstellen.

(Abb. 23 siehe Seite 69)

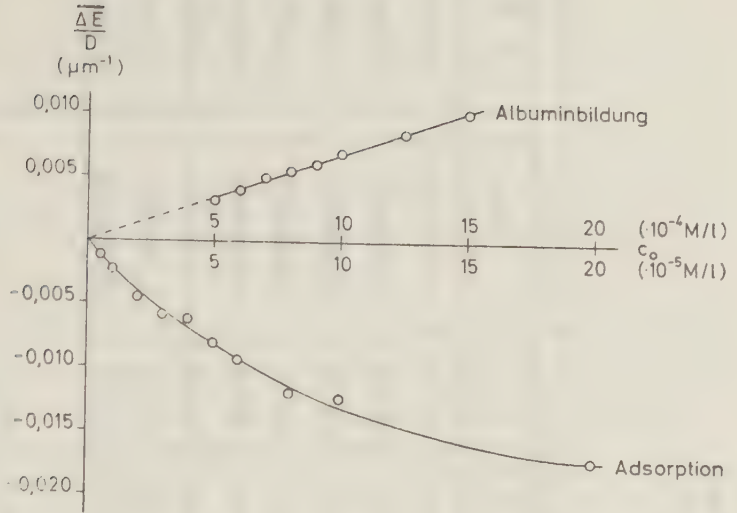


Abb. 23: Evans Blau - Adsorption und Albuminbindung

Tabelle 8: Bindung von Evans-Blau an 4%ige Albuminlösung

c_o (M/l)	1. Näherung mit $\varepsilon = \varepsilon_f = 7,758$		2. Näherung mit $\varepsilon = 7,163$		3. Näherung mit $\varepsilon = 7,162$		3. Näherung C_f (M/l)	$\frac{M}{r}$
	α	β	α	β	α	β		
0,0005	0,49	99,51	0,26	99,74	0,26	99,74	0,0000013	0,8598
0,0006	0,42	99,58	0,19	99,81	0,19	99,81	0,0000011	1,0326
0,0007	0,27	99,73	0,05	99,95	0,05	99,95	0,0000003	1,2064
0,0008	0,31	99,69	0,08	99,92	0,08	99,92	0,0000006	1,3783
0,0009	0,35	99,65	0,12	99,88	0,12	99,88	0,0000011	1,5498
0,0010	0,29	99,71	0,06	99,94	0,06	89,94	0,0000006	1,7231
0,00125	0,36	99,64	0,12	99,88	0,12	99,88	0,0000015	2,1526
0,0015	0,41	99,59	0,16	99,84	0,16	99,84	0,0000024	2,5821
Mittelwerte:	0,36	99,64	0,13	99,87	0,13	99,87		

Tabelle 9: Bindung von Evans-Blau an 1%ige Albuminlösung

C_o (N/l)	1. Näherung mit $\epsilon_f = 7,758$		2. Näherung mit $\epsilon_f = 7,167$		3. Näherung mit $\epsilon_f = 7,166$		$\frac{M}{v}$
	α	β	α	β	α	β	
0,0004	1,62	98,38	1,36	98,64	1,36	98,64	2,7214
0,0006	0,69	99,31	0,45	99,55	0,45	99,55	4,1193
0,0008	0,84	99,16	0,59	99,41	0,59	99,41	5,4848
0,0010	1,11	98,89	0,84	99,16	0,84	99,16	6,8386
Mittelwerte:	1,06	98,94	0,81	99,19	0,81	99,19	

2.4. Amaranth (Naphtholrot S)

Abb. 24 zeigt die Abhängigkeit der Meßwerte der Albuminbindung von der Gesamtkonzentration an Amaranth.

In den niedrigen Konzentrationen nimmt die Albuminbindung des Farbstoffs mit steigender Gesamtkonzentration zu bis zu einem maximalen Wert bei der Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-4}$ M/l. Weitere Steigerung der Gesamtkonzentration führt nicht zu weiterer Bindung. Die Adsorption befindet sich dagegen noch nicht im Bereich der Sättigung und nimmt weiter zu, so daß bei konstanter Konzentration an gebundenem Amaranth die Extinktionsdifferenz kleiner und bei $3,5 \cdot 10^{-4}$ M/l negativ wird.

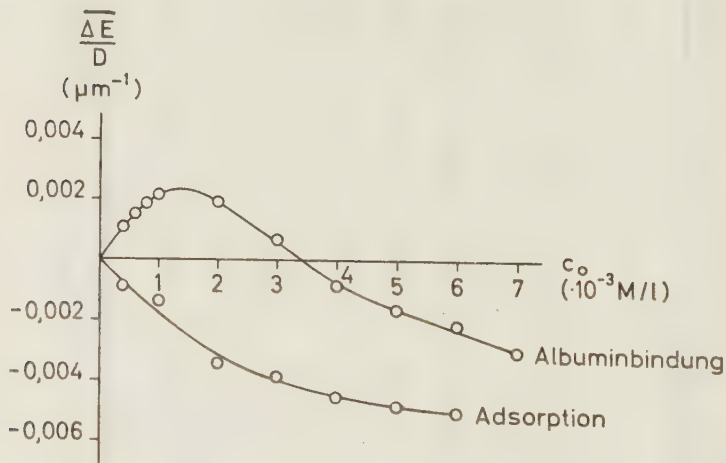


Abb. 24: Amaranth - Adsorption und Albuminbindung

Aus dieser Abhängigkeit kann man schließen, daß das Albuminmolekül für Amaranth nur sehr wenige Bindungsstellen hat, die bald gesättigt sind. Bei hohen Farbstoffkonzentrationen wird das Gleichgewicht der Bindung gestört. Diese Tatsache erklärt auch die Abnahme des spezifischen Bindungsvermögens in hohen Konzentrationen nach anfänglicher geringer Zunahme (Tab. 10).

Die gebundene Konzentration und das spezifische Bindungsvermögen müßten konstant bleiben. Dies ist deshalb nicht der Fall, weil die Differenzrechnung $(c_o - c_f)$ großer Zahlen ungenau wird. In den hohen Konzentrationen wird c_f aber zu groß, weil die Berechnung (Gl. 25) von der Voraussetzung ausgeht, daß die Adsorption gegenüber der Albuminbindung klein ist. Dies trifft für Amaranth nicht zu.

Tabelle 10: Bindung von Amaranth an 4%ige Albuminlösung

C_o (M/l)	1. Näherung mit $\epsilon = \epsilon_f = 2,47$		C_f (M/l)	$\frac{\bar{r}}{r} \frac{M}{M}$
	α	β		
0,0004*	-	-	-	
0,0006*	-	-	-	
0,0008	1,67	98,33	0,0000134	1,3562
0,001	4,66	95,34	0,0000466	1,6438
0,002	29,48	70,52	0,0005895	2,4319
0,003	56,94	43,06	0,0017081	2,2274
0,004	79,88	20,12	0,0031954	1,3872
0,005	91,99	8,01	0,0045996	0,6903
0,006	99,32	0,68	0,0059592	0,0703
0,007*	-	-	> 100	

* Die negativen Werte für C_f und der Wert > 100 liegen im Bereich der Meßungenauigkeit.

2.5. Orange GGN

Die Kurve der Albuminbindung von Orange zeigt einen ähnlichen Verlauf wie diejenige von Amaranth (Abb.25).

In den niedrigen Konzentrationen des Farbstoffs nimmt die Albuminbindung zu und erreicht mit der Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ M/l Sättigung. Das Gel kann jedoch weiteren Farbstoff adsorbieren, sodaß die Extinktionsdifferenz kleiner wird; bei der Konzentration von $7 \cdot 10^{-3}$ M/l ist sie gleich null.

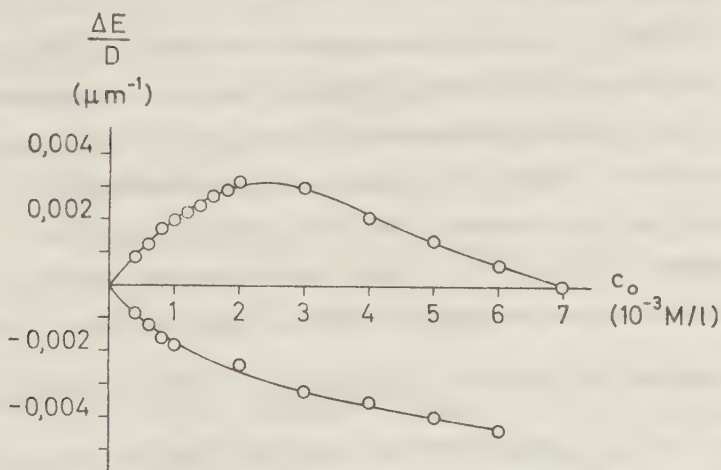


Abb. 25: Orange - Adsorption und Albuminbindung

Auch bei diesem Farbstoff bleibt die gebundene Konzentration trotz Sättigung des Albumins nicht konstant, so daß für die hohen Konzentrationen die Voraussetzung der geringen Adsorption gegenüber der Albuminbindung nicht gegeben ist.

Deshalb werden diese Konzentrationen bei der graphischen Darstellung von Orange nicht berücksichtigt.

2.5.1. Prozentualer Anteil α bzw. β

Mit steigender Gesamtkonzentration von Orange nehmen die β -Werte ab, während das spezifische Bindungsvermögen bis zur Konzentration der Sättigung zunimmt (Tab.11).

2.5.2. Gesamtbindungskonstante, Anzahl der Bindungsstellen, freie Reaktionsenergie

Die Darstellung der Abhängigkeit zwischen dem reziproken spezifischen Bindungsvermögen und der reziproken freien Farbstoffkonzentration sowie die Darstellung nach SCATCHARD ergeben für Orange eine gekrümmte Linie. Danach muß man annehmen, daß die Albuminbindung von Orange durch mehr als einen Satz bindender Gruppen mit verschiedenen Bindungskonstanten charakterisiert ist.

Aus Abb. 26 läßt sich ein Wert von 4,5 für n ablesen.

Die Kurve der Abb. 27 läßt sich nach KARUSH (1950) in zwei geraden zerlegen, die je einem Satz bindender Gruppen mit einer Gesamtbindungskonstanten entsprechen. Danach wird, die Albuminbindung von Orange durch einen Satz mit 4,5 Bindungsstellen und einer Bindungskonstanten $K_1 = 1,9 \cdot 10^4$ l/M und einem zweiten Satz mit 2,4 Bindungs-

stellen und einer Bindungskonstanten $K_2 = 9,3 \cdot 10^4 \text{ l/M}$ charakterisiert.

Die freie Reaktionsenergie des ersten Satzes beträgt - 5860 cal/Mol; die des zweiten - 6800 cal/Mol.

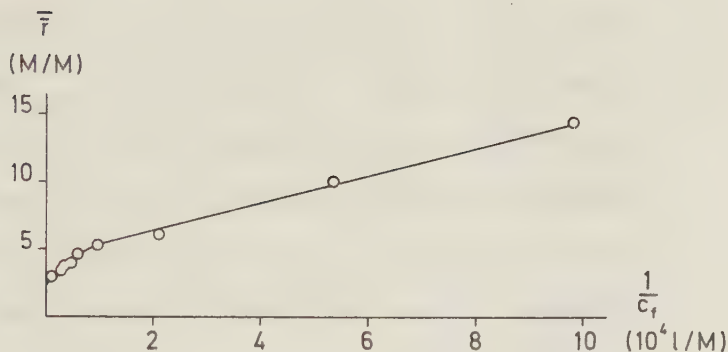


Abb. 26: Orange - Abhängigkeit des reziproken spezifischen Bindungsvermögens von der reziproken freien Farbstoffkonzentration.

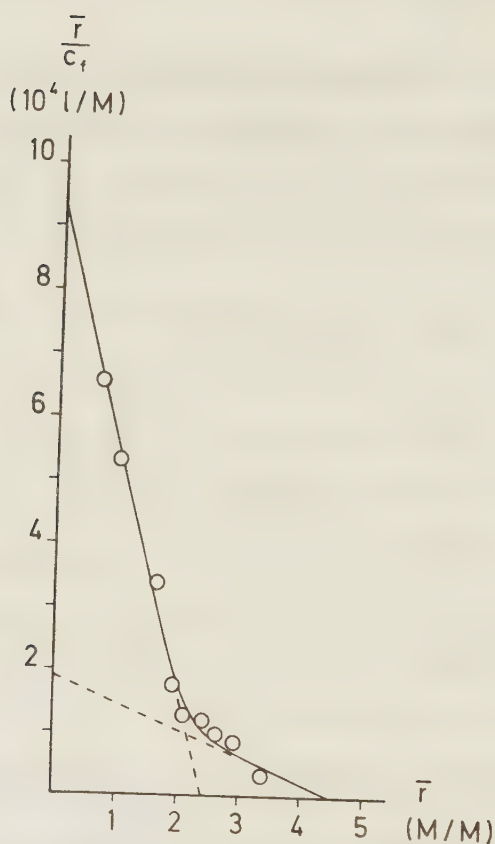


Abb. 27: Orange - Abhängigkeit des Quotienten $\frac{\bar{r}}{c_f}$ vom spezifischen Bindungsvermögen.

Tab. 11: Bindung von Orange an 4%ige Albuminlösung

c_o (M/l)	1. Näherung		$\frac{r}{M}$	c_f (M/l)
	α	β		
0,0004	2,56	97,44	0,67	0,0000102
0,0006	3,12	96,88	1,00	0,0000187
0,0010	4,78	95,22	1,64	0,0000478
0,0012	8,86	91,14	1,88	0,0001063
0,0014	11,80	88,20	2,13	0,0001651
0,0016	12,46	87,54	2,42	0,0001993
0,0018	15,37	84,63	2,63	0,0002766
0,0020	16,55	83,45	2,88	0,0003311
0,0030	34,93	65,07	3,36	0,0010478
0,0040	56,15	43,85	3,02	0,0022461
0,0050	70,29	29,71	2,56	0,0035144
0,0060	82,18	17,82	1,84	0,0049309

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Methode

Vergleicht man die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur quantitativen Bestimmung der Proteinbindung mit den bekannten Verfahren, insbesondere mit der Dialyse, Ultrazentrifugation und Gelfiltration, so zeigen sich folgende Vor- und Nachteile:

- a) Die Versuchsdauer ist erheblich kürzer als die der bekannten Methoden. Nach dreistündigem Quellen des Gels kann die Messung sofort erfolgen (10 Kugeln werden in 10 Minuten gemessen).
- b) Trennung des freien vom gebundenen Anteil und Messung der freien Konzentration der niedermolekularen Substanz erfolgen in einem Meßvorgang. Bei den bekannten Methoden wird zunächst im ersten Arbeitsgang der freie Anteil abgetrennt, in einem zweiten Arbeitsgang wird die freie Konzentration nach verschiedenen - meist photometrischen - Verfahren bestimmt.
- c) Die Adsorption an das Gel wird bei der Berechnung der freien Konzentration berücksichtigt. Mit der Bestimmung der Adsorption sind insgesamt zwei Messungen nötig, um den freien Anteil zu bestimmen, bei den bekannten Methoden sind es drei Messungen.

- d) Während der Gleichgewichtseinstellung tritt weder eine Verdünnung der wässrigen Phase noch eine Konzentration der eiweißhaltigen Phase ein. Daher kann auf diese Weise das Gleichgewicht nicht gestört werden. Diese Bedingungen kommen den Verhältnissen der Proteinbindung in vivo recht nahe.
- e) Der meßbare Konzentrationsbereich liegt in einer Größenordnung, bei der Sättigung des Proteins bald erreicht werden kann. Dies ist wichtig für die Charakterisierung der Bindung.
- f) Bei dieser Mikromethode werden zur Messung der Proteinbindung einer Konzentration der niedermolekularen Substanz 50 - 100 μ l Ansatz benötigt. Bei den bekannten Methoden sind zwischen 1 und 10 ml erforderlich.

Die Nachteile der Methode haften z.T. den bekannten Verfahren ebenso an.

- a) So wirkt sich eine hohe Adsorption bei allen Methoden störend auf die Gleichgewichtseinstellung aus. Bei der vorliegenden Methode ist dazu die Voraussetzung für die Berechnung der freien Konzentration nicht mehr gegeben.

- b) Die Ausgangskonzentration des niedermolekularen Stoffs läßt sich nicht beliebig verringern, daher können die Meßergebnisse von Substanzen mit nahezu 100-%iger Bindung nicht graphisch dargestellt werden.
- c) Schließlich kann mit dieser Methode nur die Proteinbindung farbiger Substanzen bestimmt werden. Bei Messungen im ultravioletten Spektralbereich tritt die hohe Absorption des Proteins in den Vordergrund, sodaß die Messung in Form der Extinktionsdifferenz nicht mehr möglich ist.

Will man die entwickelte Methode anwenden, muß darauf geachtet werden, den hier angegebenen Sephadextyp zu benutzen. Bei einem anderen Typ (z.B. Sephadex G 25) muß zunächst der Matrixanteil neu bestimmt werden. Die Meßergebnisse der Adsorption und der Proteinbindung müssen die erwähnten Voraussetzungen zur Berechnung der freien Konzentration erfüllen.

2. Diskussion der Ergebnisse

Erythrosin gehört zu den basischen Phthaleinfarbstoffen, die im allgemeinen geringe Albuminbindung zeigen.

Für Erythrosin fanden jedoch PFAFF und HEROLD (1937) mit Hilfe der Diffusion in Gelatinegallerte Bindung an Albumin; sie konnten allerdings keine quantitativen Angaben machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für Erythrosin im Konzentrationsbereich von $1 - 6 \cdot 10^{-3}$ M/l eine Albuminbindung von 85,8 % ermittelt, wobei maximal 15 Erythrosinmoleküle von einem Albuminmolekül gebunden werden; die freie Energie dieser Bindung beträgt -5750 cal. Mol. Diese recht intensive Bindung von Erythrosin, das 4 Jodatome im Molekül besitzt, entspricht der Feststellung von SCHOLTAN (1968), daß Einführung von Halogenatomen die Bindungsaffinität erhöht.

Die übrigen in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffe gehören zu den sauren Azofarbstoffen, deren Bindung an Albumin bekannt ist. So stellte BENNHOLD (1938) ebenfalls mittels Diffusion in Gelatinegallerte Albuminbindung von Chrysoin fest, ohne quantitative Angaben zu machen. Mit der hier entwickelten Methode beträgt der prozentuale Anteil an gebundenem Chrysoin im Konzentrationsbereich von $0,2 - 1,5 \cdot 10^{-3}$ M/l zwischen 90,8 und 77,8 %. Die Kapazität der 4 %-igen

Albuminlösung ist für Chrysoin mit maximal 3,3 Bindungsstellen kleiner als für Erythrosin; die Affinität ist dagegen mit einer freien Reaktionsenergie von -5842 cal/Mol größer.

Für Evans Blau, das zur Blutvolumenbestimmung verwandt wird, fand RAWSON (1943) vollständige Bindung an Albumin mittels Elektrophorese und Ultrazentrifuge und eine Veränderung des Absorptionsspektrums in Albuminlösung gegenüber Pufferlösung im Sinne einer Verringerung der optischen Dichte und einer Rotverschiebung. Mit den Ergebnissen von RAWSON stimmen die Werte dieser Arbeit überein, in der der prozentuale Anteil an gebundenem Evans Blau im Konzentrationsbereich von $5 - 15 \cdot 10^{-4}$ M/l zu 99,87 bestimmt wurde. Das Absorptionsspektrum von Evans Blau zeigt in 4 %-iger Albuminlösung wie bei RAWSON Rotverschiebung und Erniedrigung des Absorptionsmaximums.

Die Proteinbindung von Amaranth wurde von KLOTZ (1946) und KLOTZ und WALKER (1947) untersucht, die für diesen Farbstoff eine flach ansteigende Bindungskurve fanden. Sie entspricht der in dieser Arbeit gefundenen geringen Affinität von Amaranth gegenüber den anderen Farbstoffen. Im Konzentrationsbereich von $0,4 - 7 \cdot 10^{-3}$ M/l sinkt der prozentuale Anteil an gebundenem Amaranth von 98,3 auf 0,7 % ab; aus dem spezifischen Bindungsvermögen läßt sich die maximale Anzahl Bindungsstellen auf 2 abschätzen.

Die Proteinbindung von Orange läßt sich mit der vorliegenden Methode durch 2 Bindungstypen beschreiben, wobei der erste Bindungstyp mit maximal 4,5 Bindungsstellen durch eine freie Reaktionsenergie von -5860 cal/Mol charakterisiert ist; der zweite Bindungstyp mit weniger (2,4) Bindungsstellen ist durch eine größere freie Reaktionsenergie (-6800 cal/Mol) charakterisiert. Diese Art der Bindung ist der Bindung von Salicylaten vergleichbar (DAVISON und SMITH, 1961). KLOTZ (1946) konnte feststellen, daß Salicylate Azofarbstoffe aus ihrer Proteinbindung verdrängen, so daß anzunehmen ist, daß beide an den gleichen Stellen des Albuminmoleküls gebunden werden.

SCHOLTAN (1962) zeigte, daß in konzentrierten Proteinlösungen, in denen sich lockere Aggregate der Albuminmoleküle bilden, die maximale Anzahl Bindungsstellen für die niedermolekulare Substanz nicht frei zur Verfügung steht. Deshalb braucht der Wert für n - wie es in dieser Arbeit der Fall ist - nicht geradzahlig zu sein. In verdünnten Proteinlösungen lockern sich die Aggregate, und es werden mehr Bindungsstellen frei. Auf diese Erscheinung ist es zurückzuführen, daß das spezifische Bindungsvermögen einer Verdünnungsreihe von Evans Blau in 4 %-iger Albuminlösung geringer ist als in 1 %-iger Albuminlösung.

Da die Farbstoffe sowohl apolare Ringstrukturen als auch ionisierbare Gruppen besitzen, ist anzunehmen, daß sowohl die hydrophobe Wechselwirkung als auch die elektrostatische Anziehung bei ihrer Proteinbindung eine Rolle spielt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Proteinbindung niedermolekularer farbiger Substanzen mittels Mikrophotometrie an einzelnen Sephadexkugeln angegeben.

Die für eine Bestimmung benötigte Menge Ansatz beträgt 50-100 μ l.

Der Anteil der Gelmatrix am Gesamtvolumen der Kugel wurde für Sephadex G 50 fine zu 0,201 = 20 % bestimmt.

Der Adsorption der Farbstoffe Erythrosin, Chrysoin, Evans Blau, Amaranth und Orange in wässriger Lösung an die Sephadexmatrix wurde die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme zugrunde gelegt. Tabelle 12 zeigt die berechneten Konstanten der Adsorption. Evans Blau wird am stärksten an das Gel adsorbiert.

Tabelle 12: Adsorptionskonstanten der Farbstoffe

Farbstoff	a	b
Evans Blau	0,02261	0,000086
Erythrosin	0,01628	0,002469
Chrysoin	0,00910	0,001532
Amaranth	0,00667	0,001680
Orange	0,00570	0,002234

Die Bindung der fünf Farbstoffe an 4 %-ige Rinder-serumalbuminlösung wurde bestimmt.

Die Trennung des freien vom gebundenen Anteil der Farbstoffe im Gleichgewicht erfolgt durch Diffusion des freien Anteils in die Poren der Sephadexkugel unter Ausschluß des gebundenen Anteils. Die Bestimmung der gebundenen Konzentration besteht in der Messung der Extinktionsdifferenz zwischen freiem und gebundenem Anteil in der Umgebung der Kugel und freiem Anteil in der Kugel.

Der Rechengang zur Ermittlung der freien Konzentration unter Berücksichtigung der Adsorption wird angegeben. Ein iteratives Verfahren erfaßt die Änderung des molaren Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe in Albuminlösung.

Die beiden Farbstoffe Erythrosin und Evans Blau werden konzentrationsunabhängig an Albumin gebunden.

Der gebundene Anteil β beträgt für Erythrosin

($0,5 - 6 \cdot 10^{-3}$ M/l) 85,8 %, für Evans Blau ($5 - 15 \cdot 10^{-4}$ M/l) 99,87 %.

Die übrigen Farbstoffe werden in Abhängigkeit von ihrer Konzentration in verschiedenem Ausmaß an Albumin gebunden. Der gebundene Anteil β nimmt für Amaranth zwischen $0,4$ und $7 \cdot 10^{-3}$ M/l Werte von 98,3 bis 0,7 % an; für Chrysoin zwischen $0,2$ und $1,5 \cdot 10^{-3}$ M/l Werte von 90,8 bis 77,8 %; für Orange zwischen $0,4$ und $7 \cdot 10^{-3}$ M/l Werte von 97,4 bis 17,8 % an.

Die Bindungswerte wurden nach bekannten Methoden graphisch dargestellt. Die so erhaltenen Bindungskonstanten (K_1), Anzahl der Bindungsstellen (n) und freie Reaktionsenergien (ΔF^0) zeigt Tabelle 13.

Evans Blau und Amaranth lassen sich nicht graphisch darstellen. Die Bindung von Erythrosin und Chrysoin wird durch einen Satz bindender Gruppen, die von Orange durch zwei Sätze bindender Gruppen charakterisiert.

Tabelle 13: Maximale Anzahl Bindungsstellen, Bindungskonstante und freie Reaktionsenergie der Farbstoffe

Farbstoff	n	K_1 (l/M)	ΔF^0 (cal/Mol)
Erythrosin	15,3	$1,59 \cdot 10^4$	- 5750
Chrysoin	3,3	$1,86 \cdot 10^4$	- 5840
Evans Blau	~ 3	-	-
Amaranth	~ 2	-	-
Orange	4,5(n_1)	$1,9 \cdot 10^4(K_1)$	- 5860
	2,4(n_2)	$9,3 \cdot 10^4(K_2)$	- 6800

Literaturverzeichnis

- | | | |
|---|------|--|
| Barber, A.A. et al. | 1962 | Clin. chim. acta <u>8</u> : 143 |
| Bennhold, H. | 1938 | Die Vehikelfunktion der Blut-eiweißkörper, Kapitel in: Bennhold, Kylin, Rusznyak: Die Eiweißkörper des Blutplasmas Steinkopf Verlag, Leipzig |
| Bird, A.E.
Marshall, A.C. | 1967 | Biochem. Pharm. <u>16</u> : 2275 |
| Boguth, W.
Repges, R. | 1967 | Z. Wiss. Mikrosk. <u>68</u> : 241 |
| Boguth, W.
Repges, R.
Sernetz, M. | 1968 | Z. Analyt. Chem. <u>243</u> : 464 |
| Borga, O. et al. | 1969 | Biochem. Pharm. <u>18</u> : 2135 |
| Brodie, B.B.
Hogden, C.A.M. | 1957 | J. Pharm. Pharmacol. <u>9</u> : 345 |
| Brodie, B.B. | 1964 | Physico-chemical factors in drug absorption, Kapitel in: T.B. Binns: Absorption and Distribution of Drugs; Livingstone, Edinburgh |
| Brodie, B.B. | 1965 | Proc. roy. Soc. Med. <u>58</u> : 946 |
| Daughaday, W.A. et al. | 1962 | J. clin. Endocr. <u>22</u> : 704 |
| Davis, B.D.
Wood, W.B. | 1942 | Proc. Soc. exp. Biol. Med. <u>51</u> : 283 |
| Davis, B.D. | 1943 | J. clin. Invest. <u>22</u> : 753 |

II.

Davison, C. Smith, P.K.	1961	J. Pharmacol. exp. Ther. <u>122</u> : 161
Flexner, L.B.	1937	J. Biol. Chem. <u>121</u> : 615
Franke, R. Büchner, M.	1967	Acta biol. med. german. <u>19</u> : 1047
Franke, R.	1968	Biochem. Biophys. Acta <u>160</u> : 378
Goldsmith, R.E. et al.	1967	Acta endocr. <u>54</u> : 494
Goldstein, A.	1949	Pharmacol. Rev, <u>1</u> : 120
Goodman, DeWitt S.	1958	J. Amer. chem. Soc. <u>80</u> : 3892
Hansch, C. Kiehs, K. Lawrence, G.L.	1965	J. Amer. chem. Soc. <u>87</u> : 5770
Higgins, B. Richards, J.H.	1967	J. Pharm. Pharmac. <u>19</u> : 641
Hochheuser, W. et al.	1969	Klin. Wschr. <u>47</u> : 300
Hom, B. Olesen, H.	1967	Scand. J. clin. Lab. Invest. <u>19</u> : 269
Hughes, T.R. Klotz, I.M.	1956	Analysis of Metal-Protein Complexes, Kapitel in: D. Glick: Methods of Biochemical Analysis 3; Interscience Publishers, New York
Jähnchen, E. et al.	1969	Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. <u>263</u> : 375
Jardetzky, O.	1967	Naturwiss. <u>7</u> : 149
Karush, F.	1950	J. Amer. chem. Soc. <u>72</u> : 2705

III.

Karush, F.	1951	J. Amer. chem. Soc. <u>73</u> : 1246
Klotz, I.M.	1946a	Arch. Biochem. <u>9</u> : 109
Klotz, I.M.	1946b	J. Amer. chem. Soc. <u>68</u> : 2299
Klotz, I.M.	1947	J. Amer. chem. Soc. <u>69</u> : 1609
Walker, F.M.		
Kriegelstein, J.	1969	Klin. Wschr. <u>47</u> : 1125
Kriegelstein, J.	1968	Arzneimittel-Forsch. <u>18</u> : 287
Kuschinsky, G.		
Lee, M.	1963	J. Chromatog. <u>10</u> : 68
Debro, J.R.		
Murphey, B.E.P.	1967a	J. clin. Endocr. <u>27</u> : 973
Murphey, B.E.P.	1967b	Can. J. Biochem. <u>46</u> : 299
Nemethy, G.	1967	Angew. Chem. <u>79</u> : 260
Newbold, B.B.	1960	Lancet <u>60</u> : 887
Kilpatrick, P.		
Pfaff, W.	1937	Grundlagen einer neuen Therapie-
Herold, W.		forschung der Tuberkulose, Leipzig
Rawson, R.A.	1943	Am. J. Physiol. <u>138</u> : 708
Rodkey, F.L.	1961	Arch. Biochem. Biophys. <u>94</u> : 38 und 526
Scatchard, G.	1949	Ann. N. Y. Acad. Sci. <u>51</u> : 660
Scatchard, G. et al.	1950	J. Amer. chem. Soc. <u>72</u> : 535
Scholtan, W.	1962	Makromolek. Chem. <u>54</u> : 24

IV.

Scholtan, W.	1964	Arzneimittel-Forsch. <u>14</u> : 146
Scholtan, W.	1965	Arzneimittel-Forsch. <u>15</u> : 1433
Scholtan, W.	1966	Arzneimittel-Forsch. <u>16</u> : 109
Scholtan, W.	1968	Arzneimittel-Forsch. <u>18</u> : 505
Solomon, H.M.	1967	Biochem. Pharmacol. <u>16</u> : 1219
Schrogie, J.J.		
Teresi, J.D.	1952	J. biol. Chem. <u>194</u> : 823
Luck, J.M.		
Thorp, J.M.	1964	The Influence of Plasma Proteins on the Action of Drugs, Kapitel in: T.B. Binns: Absorption and Distribution of Drugs; Living- stone, Edinburgh
Wyman, J.	1948	Advances in Protein Chem. <u>4</u> : 407

Lebenslauf

Tierärztin Melitta Just, geb. Rasch
63 Gießen

29. 2.1944 geboren als Tochter des kaufmännischen Angestellten Fritz Rasch und seiner Frau Anna-Katharina, geb. Konrath, in Ratingen bei Düsseldorf
- 1950-1954 Besuch der Volksschule in Niederbieber, Kr. Neuwied
- 1954-1963 Besuch des Gymnasiums für Mädchen in Neuwied
1. 3.1963 Reifeprüfung
- SS 1963 - Studium der Veterinärmedizin an der Justus
WS 1967/68 Liebig-Universität Gießen
22. 4.1965 Tierärztliche Vorprüfung
- WS 1965/66 Studium an der Tierärztlichen Hochschule in Wien
12. 2.1968 Tierärztliche Prüfung
- April 1968 - Veterinärpraktikantenzeit bei Dr. R. Buchen
Oktober 1968 in Wissen/Sieg
- 1.10.1968 Tierärztliche Approbation
- Seit Mai Mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen
1969 Assistentenstelle am Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus Liebig-Universität beauftragt
Anfertigung dieser Dissertation

Herrn Professor Dr. Dr. W. Boguth bin ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und insbesondere für seine unermüdliche Unterstützung zu größtem Dank verpflichtet.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Endokrinologie danke ich für ihre bereitwillige Hilfe.

